

# **Einnistung von *Pseudomonas aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme: Eine Frage der EPS?**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Duisburg-Essen

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Chemiker

Daniel Bressler

aus

Duisburg

Datum der Einreichung: 18.12.2008

Datum der mündlichen Prüfung: 26.02.2009

Referent: Prof. Dr. H.-C. Flemming

Korreferent: Prof. Dr. W. Sand

**Duisburg, 2008**

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Curt Flemming für die Überlassung dieses interessanten und anspruchsvollen Forschungsthemas. Darüber hinaus bedanke ich mich für seine Unterstützung bei meiner wissenschaftlichen Arbeit und der Erweiterung meines geistigen Horizonts.

Herrn Dr. Jost Wingender möchte ich ganz besonders für seine unermüdliche Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für seine fachliche Unterstützung danken.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Sand danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ich danke den Mitarbeitern der Aquatischen Mikrobiologie für die freundschaftlich kollegiale Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit. Insbesondere bei Astrid Dannehl und Diana Spettmann möchte ich mich für ihre Unterstützung bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Lieben, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Abkürzungen .....	1
Zusammenfassung .....	3
1 Einleitung.....	4
1.1 Biofilme.....	4
1.1.1 Biofilmcharakterisierung .....	6
1.1.2 EPS .....	12
1.2 EPS-Isolierung.....	15
1.3 EPS-Charakterisierung.....	18
1.4 Trinkwasser .....	20
1.4.1 Pathogene Mikroorganismen im Trinkwasser.....	22
1.4.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	22
1.4.1.1.1 EPS von <i>P. aeruginosa</i> .....	24
1.5 Nachweis von <i>P. aeruginosa</i> .....	25
1.5.1 Nachweis von <i>P. aeruginosa</i> nach DIN .....	25
1.5.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	26
1.6 Biofilme in Trinkwasserverteilungssystemen und ihre Rolle als Habitat für hygienisch relevante Mikroorganismen .....	27
1.7 Zielsetzung .....	31
2 Material.....	32
2.1 Mikroorganismen .....	32
2.2 Gen-Sonden .....	33
2.3 Nährmedien .....	33
2.4 Chemikalien.....	35
2.5 Kits, Puffer und Lösungen .....	37
2.6 Fluoreszenzfarbstoffe und fluoreszenzmarkierte Lektine .....	39
2.7 Geräte .....	40
2.7.1 Mikroskope .....	40
2.7.2 Photometer .....	41
2.7.3 Fluorimeter .....	41
2.7.4 Laborgeräte .....	41
2.8 Software .....	42
2.9 Sonstiges.....	42
3 Methoden .....	43
3.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden .....	43
3.1.1 Stammhaltung .....	43
3.1.2 Anzucht der Bakterien für die EPS-Isolierung .....	43
3.1.3 Anzucht der Bakterien für die Einnistungsexperimente .....	43
3.2 EPS-Isolierung.....	44
3.2.1 Trockenmasse und Glühverlust.....	44
3.2.2 Methoden der EPS-Isolierung .....	46
3.2.2.1 EPS-Isolierung durch Rühren (Rühr-Methode).....	46
3.2.2.2 EPS-Isolierung mit einem Vortex.....	46
3.2.2.3 EPS-Isolierung mit dem Kationentauscher Dowex .....	46

3.2.2.4	EPS-Isolierung mit Formaldehyd mit und ohne NaOH .....	48
3.2.2.5	EPS-Isolierung mit dem Stomacher.....	49
3.2.3	EPS-Analytik.....	50
3.2.3.1	Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes .....	50
3.2.3.1.1	Bestimmung des Uronsäuregehaltes .....	51
3.2.3.2	Bestimmung des Proteingehaltes .....	52
3.2.3.2.1	Bestimmung des Proteingehaltes mit NanoOrange .....	52
3.2.3.2.2	Bestimmung des Proteingehaltes in Anlehnung an Lowry .....	53
3.2.3.3	Bestimmung des Huminstoffgehaltes .....	54
3.2.3.4	Bestimmung des DNA-Gehaltes .....	55
3.2.3.5	Bestimmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenaseaktivität.....	56
3.3	Einnistungsexperimente .....	57
3.3.1	Trinkwasseruntersuchungen .....	57
3.3.2	Biofilmanzucht und Einnistung .....	57
3.3.2.1	Kleinreaktor .....	57
3.3.2.2	Einrichtung und Betrieb des Kleinreaktors.....	58
3.3.2.3	Inokulierung und Beprobung der Biofilme.....	58
3.3.3	Biofilmparameter .....	59
3.3.3.1	Bestimmung der Gesamtzellzahl mit DAPI .....	59
3.3.3.2	Bestimmung der Koloniezahl .....	60
3.3.3.2.1	Bestimmung der Koloniezahl auf R2A-Medium .....	60
3.3.3.2.2	Bestimmung der Koloniezahl auf CN-Medium .....	60
3.3.4	Färbetechniken mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	61
3.3.4.1	Visualisierung von Bakterien in Biofilmen .....	61
3.3.4.2	Visualisierung von EPS-Bestandteilen .....	61
3.3.5	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	62
3.3.5.1	FISH auf Objektträgern.....	62
3.3.5.2	FISH im Biofilm.....	63
3.3.5.3	Quantitative FISH auf Filtern .....	64
4	Ergebnisse .....	66
4.1	Evaluierung von Methoden für die EPS-Isolierung .....	66
4.1.1	EPS-Isolierung von <i>P. aeruginosa</i> -Reinkulturen.....	67
4.1.2	EPS-Isolierung aus Umweltproben.....	73
4.1.2.1	Lysimeter-Schmutzdecken .....	74
4.1.2.2	Fließgewässerbiofilme .....	76
4.1.2.3	Biofilme aus der Papierherstellung .....	77
4.1.3	Isolierung von EPS aus Trinkwasserbiofilmen.....	78

4.2	Einnistungsexperimente .....	80
4.2.1	Charakterisierung des Trinkwassers .....	80
4.2.2	Charakterisierung der Biofilme nach 14 Tagen Anzucht.....	81
4.2.3	Einnistung von <i>P. aeruginosa</i> in Trinkwasserbiofilme.....	86
4.2.3.1	Wiederfindung von verschiedenen <i>P. aeruginosa</i> -Stämmen in Trinkwasser .....	88
4.2.3.2	Wirkung von Kupfer auf <i>P. aeruginosa</i> .....	92
4.2.3.3	Vorversuche zur Einnistung von <i>P. aeruginosa</i> in Trinkwasserbiofilme .....	94
4.2.3.4	Einnistung von <i>P. aeruginosa</i> DSM 50071 in Trinkwasserbiofilme..	96
4.2.3.5	Einfluss des mucoiden Phänotyps auf die Einnistung in Trinkwasserbiofilme .....	101
4.2.3.6	Einnistung von <i>P. aeruginosa</i> PA14 in Trinkwasserbiofilme .....	112
4.2.3.7	Einfluss von Lektinen (LecA / LecB) auf die Einnistung in Trinkwasserbiofilme .....	114
4.2.3.8	Vergleich der Stämme untereinander .....	121
4.2.3.9	Visualisierung von <i>P. aeruginosa</i> mittels Fluoreszenz-in-situ- Hybridisierung (FISH) .....	124
4.2.4	EPS-Isolierung von Biofilmen mit eingenistetem <i>P. aeruginosa</i> .....	129
5	Diskussion .....	131
5.1	EPS-Isolierung.....	133
5.1.1	EPS-Isolierung aus Reinkulturbiofilmen von <i>P. aeruginosa</i> .....	134
5.1.2	EPS-Isolierung aus Umweltproben.....	136
5.1.3	Bewertung der EPS-Isolierungsmethoden.....	138
5.1.4	Miniaturisierung des Verfahrens für die EPS-Isolierung .....	141
5.2	Einnistung von <i>P. aeruginosa</i> in Trinkwasserbiofilme.....	143
5.2.1	Auswirkungen von im Wasser gelöstem Kupfer auf <i>P. aeruginosa</i> ....	145
5.2.2	Einnistungsverhalten von <i>P. aeruginosa</i> in Bezug auf die unterschiedlichen Stämme .....	151
5.2.3	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) in Trinkwasserbiofilmen ...	156
5.2.3.1	FISH bei Bakterien-Suspensionen.....	156
5.2.3.2	FISH im Biofilm.....	158
5.2.4	EPS-Isolierung von Biofilmen mit eingenistetem <i>P. aeruginosa</i> .....	160
5.3	Fazit.....	161
5.4	Ausblick .....	162
6	Literatur .....	163

## Abkürzungen

AFM	Atomic Force Microscopy (Rasterkraftmikroskopie)
Animpfsusp.	Animpfsuspension
ATR	Abgeschwächte Total Reflexion (Attenuated Total Reflectance)
BF	Biofilm
BSA	Rinderserumalbumin
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton
CE	Kapillar Elektrophorese
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
CTC	5-Cyano-2,3-ditoly-tetrazoliumchlorid
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid
DiBAC <sub>4</sub> (3)	Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscope
ESI	Electrospray-Ionisation
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FTICR	Fourier-Transform Cyclotron Resonance
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
G6PDH	Glycose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Gas Chromatographie
GV	Glühverlust
GZZ	Gesamtzellzahl
HPC	Heterotrophic Plate Count
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
HPAEC	High Performance Anion-Exchange Chromatography
Hrsg.	Herausgeber
KBE	Koloniebildende Einheit
kD	Kilo-Dalton
LC	Flüssigkeitschromatographie (Liquid Chromatography)
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
MS	Massenspektroskopie
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrogen
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kern-Magnet-Resonanz)
n. n.	nicht nachweisbar
OCD	Organischer Kohlenstoffdetektor (Organic Carbon Detector)
P. a.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

PAD	Puls Amperometric Detection
PAS	Photoakustische Mikroskopie
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PIA	Pseudomonas Isolierungsagar
PMMA	Polymethyl-Methacrylat
rRNA	ribosomal Ribonucleic Acid
RPM	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
SEM	Scanning–Electron-Microscopy
STXM	Scanning Transmission X-Ray Microscopy
TM	Trockenmasse
ToF	Time of Flight (Flugzeit)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
TW	Trinkwasser
VBNC	Viable But Not Culturable (lebensfähig aber nicht kultivierbar)

## Zusammenfassung

Biofilme gelten als mögliches Reservoir für hygienisch relevante Mikroorganismen in Trinkwassersystemen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, unter welchen Bedingungen sich solche Mikroorganismen einnisten und persistieren können, und zwar in Abhängigkeit von den extrazellulären polymeren Substanzen (EPS). Diese Untersuchungen wurden anhand verschiedener Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* durchgeführt. Um den Einfluss der EPS zu prüfen, wurden 2 mucoide, 4 nicht-mucoide und 2 Lektin-Defekt-Mutanten eingesetzt.

Zunächst galt es, die Methode der EPS-Isolierung zu optimieren. Ein Ansatz beruht auf der Entfernung verbrückender Kationen durch Verwendung eines Kationenaustauschers. Verglichen wurde dies mit weiteren Methoden, z. B. der Behandlung mit Formaldehyd und NaOH sowie der Dispergierung ohne weitere Hilfsmittel. Diese Untersuchungen wurden an Biofilmprouben aus Fließgewässern, Lysimetern sowie von Langsandsandfiltern der Trinkwasser-Aufbereitung und Biofilmen aus der Papierherstellung durchgeführt und hinsichtlich der EPS-Ausbeute verglichen. Es zeigte sich, dass die Kationenaustauscher-Methode mehr erbrachte als allein durch Dispergierung gewonnen werden konnte, wobei eine Zellschädigung nicht zu erkennen war. Diese wurde durch Auftreten des strikt intrazellulär vorkommenden Enzyms Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase geprüft. Bei der Verwendung von Formaldehyd und NaOH wurde bei Umweltproben ein deutlich höherer Anteil an Kohlenhydraten und Huminstoffen gefunden, allerdings konnte Zellschädigung hier nicht geprüft werden, weil Formaldehyd/NaOH den Nachweis stören. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Kationenaustauscher-Methode verwendet. Das Verfahren wurde erfolgreich für kleine Probenvolumina (5 - 25 ml) miniaturisiert.

Die Untersuchung der Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme wurde dadurch erschwert, dass Kupfer in geringer Konzentration (ca. 80 µg/l) im Trinkwasser des Labors vorhanden ist. Dieser Einfluss konnte durch Komplexierung des Kupfers aufgehoben werden. Es zeigte sich, dass sich alle 8 Teststämme in den Trinkwasserbiofilmen etablieren konnten (Größenordnung  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup>) und dort für mindestens 7 Tage persistierten. Ein direkter Einfluss der EPS der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme darauf war nicht zu erkennen. Einen Einfluss auf die Einnistung hatten aber sowohl die Zelldichte im Inokulum als auch der physiologische Zustand von *P. aeruginosa*. Wenn die Zellen von *P. aeruginosa* sich im Hungerzustand befanden, war eine deutlich geringere Einnistung erkennbar. Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) konnte gezeigt werden, dass die Verteilung der Organismen im Biofilm sehr heterogen war. Interessanterweise beeinflussten die eingenisteten Organismen die EPS des Trinkwasserbiofilms. Mucoide Stämme führten zu einer mechanischen Destabilisierung dieses Biofilms. Ein klarer Einfluss auf den Protein-Gehalt der EPS war zu erkennen. Während der nicht exponierte Biofilm ca. 4 µg/cm<sup>2</sup> Protein enthielt, waren nach der Einnistung eines mucoiden Stammes ca. 10 µg/cm<sup>2</sup> vorhanden. Bei einem nicht-mucoiden Stamm war eine ähnliche Tendenz vorhanden, aber weniger stark.

Es lässt sich daher feststellen, dass sich sowohl mucoide als auch nicht-mucoide *P. aeruginosa*-Stämme in Trinkwasserbiofilme einnisten und dort für mindestens 7 Tage unter stagnierenden Bedingungen persistieren können. Dabei werden die EPS des Biofilms eindeutig beeinflusst. Daraus ist zu schließen, dass die Einnistung von *P. aeruginosa* zu physiologischen Veränderungen des Trinkwasserbiofilms führt.



# 1 Einleitung

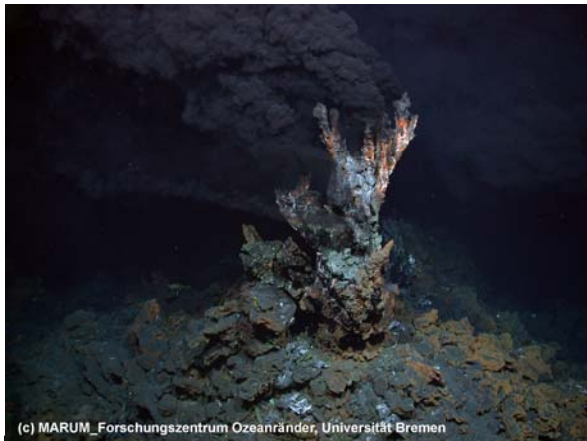
## 1.1 Biofilme

Biofilme sind eine der ältesten und erfolgreichsten (Über-)Lebensgemeinschaften auf der Erde, außerdem sind sie nahezu ubiquitär. Biofilme können in Gewässern, an Pflanzen, im Boden, im Grundwasser, auf oder in Lebewesen, in technischen Systemen usw. vorkommen (z. B.: Flemming 2008, Hall-Stoodley et al. 2004, Davey und O'Toole 2000). Es handelt sich um Ansammlungen von Mikroorganismen an Grenzflächen wie zum Beispiel den zwischen Wasser und Gas (z. B.: Wassertropfen in der Luft), Wasser und Feststoff (z. B.: Stein in einem Gewässer), Wasser und Flüssigkeit (z. B.: Öltropfen in Wasser), Flüssigkeit und Feststoff (z. B.: Rohrwand einer Öl-Pipeline) oder Feststoff und Gas (z. B. Hauswand). Nach Schätzungen kommen ca. 99 % der Mikroorganismen in Biofilmen vor (Costerton et al. 1987). Diese Ansammlung von Mikroorganismen befindet sich meistens in einer Matrix aus Wasser und extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) (z. B.: Flemming und Wingender 2003a). Der Wasseranteil kann je nach Standort variieren. In wässriger Umgebung kann er bei 98 % liegen, in trockener Umgebung auch deutlich darunter (Flemming und Wingender 2001a). Hauptsächlich bestehen diese EPS aus Kohlenhydraten (Polysacchariden), Proteinen, DNA und/oder Huminstoffen (Flemming und Wingender 2003b). Die EPS-Matrix kann aus den vielfältigsten Variationen der zuvor beschriebenen Komponenten bestehen. Damit sich Biofilme bilden können, müssen 4 Grundkomponenten vorhanden sein:

1. Mikroorganismen
2. Wasser
3. Grenzfläche
4. Nährstoffe

Sind diese Komponenten vorhanden, können sich Biofilme auch an den ungewöhnlichsten Orten bilden. Zum Beispiel konnten Biofilme in Kernkraftwerken nachgewiesen werden (z. B.: Chicote et al. 2005; Sarró et al. 2007). Des Weiteren wurden Bakterienpopulation an sogenannten "Black Smoker" (hydrothermale Quellen am Grund der Tiefsee (siehe Abb. 1)) entdeckt und untersucht (z. B.: Deming und Baross 1986; Takai et al. 2001; Takai et al. 2004). Ebenfalls wurden Studien von bakteriellen Gemeinschaften an heißen Quellen (Hot springs (siehe Abb. 2)) (z. B.: Walker et al. 2005; Weidler et al. 2007) durchgeführt und es konnten Biofilme in Öl-Pipelines analysiert werden (z. B.: Neria-González et al. 2006). Menschen können Biofilme in technischen Anlagen nutzen (z. B.: biologische Abwasserreinigung). Allerdings gibt es auch Biofilme, die dem Menschen schaden können. In der Medizin sind Besiedlungen von Implantaten mit Bakterien ein großes Gesundheitsrisiko (z. B.: Wodtke und Löhr 2008, Bryers 2008). Auch können Biofilme

Bausubstanzen und metallische Oberflächen angreifen (z. B.: Beech et al. 2005; Nuhoglu et al. 2006).



(c) MARUM\_Forschungszentrum Ozeanränder, Universität Bremen

**Abb. 1:** Black Smoker  
Quelle: MARUM, Universität Bremen

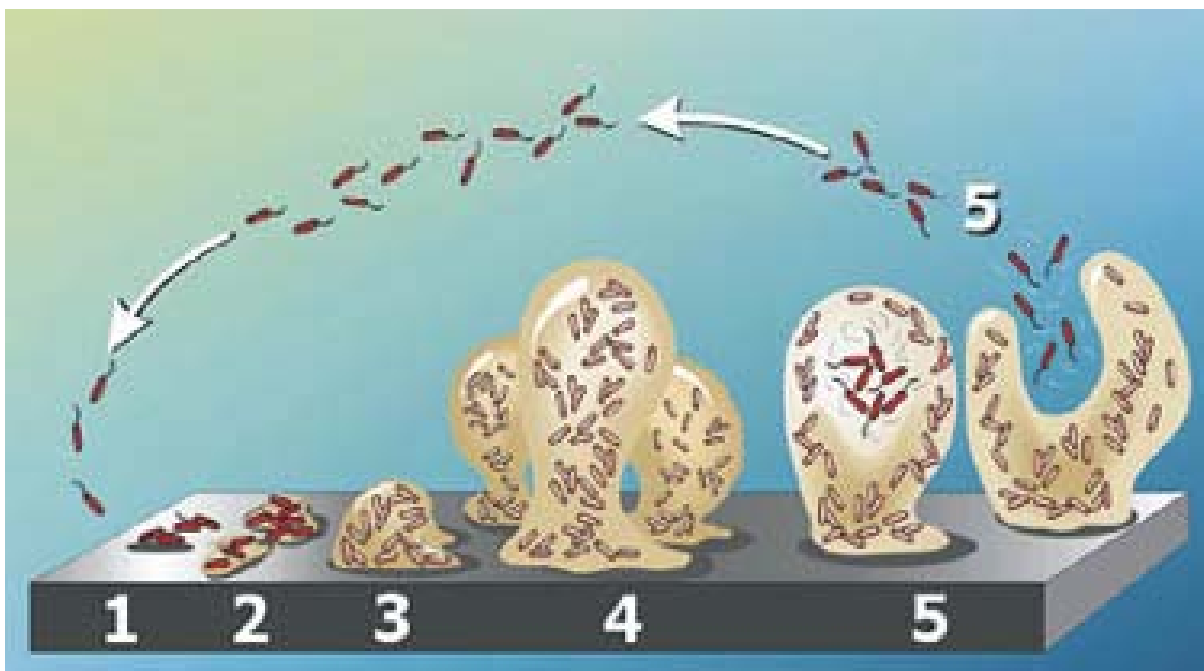


**Abb. 2:** Hot spring (Die pink aussehenden Schlieren sind chemotrophe Bakterien)

Quelle: California Academy of Sciences  
[http://www.calacademy.org/exhibits/xtremelthife/life\\_on\\_ear.php#geysers](http://www.calacademy.org/exhibits/xtremelthife/life_on_ear.php#geysers)

Die Biofilmbildung kann in mehrere Phasen unterteilt werden. Dies wurde von Stoodley et al. (2002) und auch anderen (z. B.: Sauer et al. 2002, Flemming und Wingender 2001a, Characklis 1990) beschrieben (siehe Abb. 3).

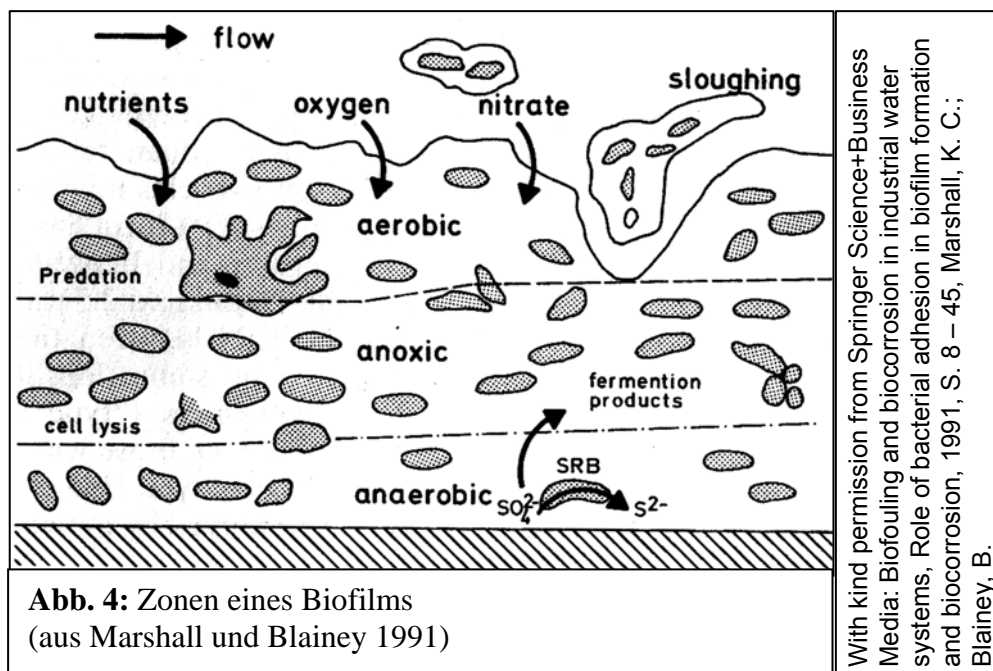
1. ① Bildung des Conditioning-Films (Anlagerung organischer Substanzen) und Besiedlung der Grenzfläche mit einzelnen Mikroorganismen.
2. ② - ④ Logarithmische Wachstumsphase (Vermehrung, EPS-Bildung und Ausprägung von Biofilmstrukturen)
3. ⑤ Plateau-Phase und Ablösung von Mikroorganismen



**Abb. 3:** Biofilmbildung (aus Stoodley et al. 2002)

Reprinted, with permission, from the Annual Review of Microbiology, Volume 56 ©2002 by Annual Reviews  
[www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)

Aufgrund der Lokalisierung der Mikroorganismen im Biofilm durch die EPS kann es zu Gradienten (z. B.: Sauerstoff, pH, etc.) innerhalb des Biofilms kommen (siehe Abb. 4). Diese können durch Dichteunterschiede im Biofilm noch begünstigt werden. Dadurch ist es möglich, dass z. B. aerobe und anaerobe Bereiche im Biofilm dicht beieinander liegen. Hierdurch kann eine hohe Biodiversität (viele unterschiedliche Mikroorganismen) gefördert werden, was weitere Interaktionsmöglichkeiten der Mikroorganismen begünstigen kann.



### 1.1.1 Biofilmcharakterisierung

Biofilme sind komplexe Systeme. Sie bestehen aus einer Vielzahl von einzelnen Komponenten (siehe 1.1), die in Wechselwirkung miteinander stehen können. Biofilme lassen sich mit einem breiten Methodenspektrum untersuchen. Denkhaus et al. (2007) (siehe Tabelle 1) liefern einen Überblick über verschiedenen Methoden und führen die mit ihnen zu erzielenden Informationen auf. Bei den Untersuchungsmethoden lässt sich grundsätzlich zwischen destruktiven und nicht destruktiven Methoden unterscheiden.

Biofilme lassen sich mit einigen Methoden in ihrem natürlichen Zustand nahezu zerstörungsfrei untersuchen. Zum Beispiel können mit mikroskopischen Techniken (Fluoreszenzmikroskopie, Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) (z. B.: Harrison et al. 2006, Möhle et al. 2007), Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) (z. B.: Priester et al. 2007, Bergmans et al. 2008)) Biofilme optisch untersucht werden. Bei mikroskopischen Untersuchungen anhand von Fluoreszenz müssen die Zielkomponenten fluoreszieren. Aber nur wenige Bestandteile des Biofilms wie zum Beispiel Tryptophan oder NADH besitzen eine natürliche Fluoreszenz (Ammor 2007). Um die gewünschten Komponenten sichtbar zu machen, müssen diese also mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden.

DNA lässt sich beispielsweise mit DNA-spezifischen Farbstoffen anfärben (z. B.: DAPI, SYTO, etc.). Diese Färbetechniken eignen sich, um Bakterien im Biofilm kenntlich zu machen. Bakterien lassen sich aber auch in ihrer Redox-Aktivität, zum Beispiel über den Redox-Farbstoff CTC (5-Cyano-2,3-ditolyl-tetrazoliumchlorid), unterscheiden (z. B.: Schaule et al. 1993). Untersuchungen der Zellwandintegrität kann man unter anderem anhand des Live/Dead-Kits (Eindringen von Propidiumiodid in die Zelle) durchführen (z. B.: Janssen et al. 2002). Die Polarisierung der Zytoplasmamembran lässt sich durch DiBAC<sub>4</sub>(3) darstellen (z. B.: Strathmann und Wingender 2004). Eine Übersicht über verschiedene Farbstoffe und ihre "Ziele" wurde von Strathmann (2002) aufgestellt (siehe Tabelle 2). Des Weiteren ist es möglich, die Topographie von Biofilmen mit der AFM (Atomic Force Microscopy) zu untersuchen. Hierbei ist auch eine Kombination mit der Fluoreszenzmikroskopie möglich, sodass die Informationen der beiden Methoden, von Untersuchungen an der selben Stelle, miteinander korreliert werden können (z. B. Mangold et al. 2008).

Um verschiedene Bakterien zu differenzieren, können diese sehr spezifisch mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH, siehe 1.4.2.) nachgewiesen werden. (z. B.: Torres et al. 2008). Ebenfalls können Bakterien genetisch so verändert werden, dass sie fluoreszierende Proteine eigenständig herstellen. Auf diese Weise können sie von anderen Bakterien unterschieden werden (z. B.: Klebensberger et al 2007, Li et al 2006). Bestimmte Parameter in den Biofilmen (z. B.: O<sub>2</sub>-Konzentration, pH-Wert, Temperatur, etc.) lassen sich mit Mikrosensoren messen (z. B.: Santegoeds et al. 1998). Hierzu können die Mikrosensoren vertikal im Biofilm bewegt werden und so Tiefenprofile der Parameter aufnehmen, ohne den Biofilm schwerwiegend zu denaturieren. Eine neuere Methode zur Charakterisierung von Biofilmpopulationen oder der Matrix in-situ ist die konfokale Ramanmikrospektroskopie (z. B.: Huang et al. 2007, Sandt et al. 2007). Die Matrix (EPS siehe 1.1.2) kann direkt im Biofilm charakterisiert werden (z. B.: Neu und Lawrence 1999a). Dieser Themenbereich wird in Abschnitt 1.3 näher erörtert.

Andere Methoden setzen eine Zerstörung des Biofilms voraus. Hierzu wird der Biofilm häufig in einem wässrigen Medium suspendiert und dann den verschiedenen Untersuchungsmethoden zugeführt. Dabei kann es sich um quantitative Bestimmungen von verschiedenen Parametern wie die Gesamtzellzahl, Koloniezahl mittels Kultivierungsverfahren, EPS-Komponenten (siehe 1.3) oder chemische Elemente (z. B.: Kupfer) handeln. Anhand der Gesamtzellzahlbestimmung, die häufig nach Porter und Feig (1980) mit DAPI durchgeführt wird, lassen sich alle Zellen nachweisen. Hierbei ist allerdings keine Aussage über den physiologischen Zustand möglich. Mit der Koloniezahlbestimmung auf einem oder mehreren verschiedenen Nährmedien lassen sich vermehrungsfähige Mikroorganismen (meistens Bakterien) nachweisen. Allerdings ist die Koloniezahl von vielen verschiedenen Faktoren abhängig. Hierzu gehören beispielsweise die Temperatur, der Druck, das Nährstoffangebot oder die Bebrütungszeit. In Proben mit vielen verschiedenen Bakterien ist eine gesicherte Aussage über die Population oder die Verhältnisse zueinander meistens nicht möglich. Biofilmpopulationen lassen sich über die

Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) untersuchen. Hierfür muss die DNA der Biofilmbakterien isoliert, mittels PCR vervielfältigt und über Gelelektrophorese aufgetrennt werden (z. B.: Besemer et al. 2007). Quantitativ lassen sich gezielt Mikroorganismen über die real-time PCR bestimmen (z. B.: Lebuhr et al. 2004). Dafür wird ein fluoreszierendes PCR-Produkt erzeugt. Über die Zunahme der Fluoreszenz während der Reaktionszeit kann auf die Anfangskonzentration des Zielorganismus geschlossen werden. Bakterien der gleichen Art sind häufig schwer zu unterscheiden. Die Pulsfeld-Gel-Elektrophorese kann hier Unterschiede in der DNA aufzeigen (z. B.: Ikeno et al. 2007, Aumeran et al. 2008). Dabei wird die DNA durch Restriktionsenzyme zerschnitten und in einem Gel aufgetrennt.

Es gibt viele Methoden Biofilme zu charakterisieren, allerdings gibt es bis heute noch keine Möglichkeit, einen Biofilm in seiner Gesamtheit zu untersuchen. Die hochgradig komplexen und teilweise miteinander wechselwirkenden Aspekte wie zum Beispiel Biozönose, Stoffwechsel, Zell-Zell-Kommunikation oder aber auch schon allein die Vorgänge in der Matrix sind in ihrer ganzen Komplexität mit den heutigen Untersuchungsmethoden kaum zu erfassen.

**Tabelle 1:** Methoden für die Biofilmuntersuchung (nach Denkhaus et al. 2007)  
(Literaturzitate sind in der Originalveröffentlichung enthalten)

Methode	Typ der gewonnenen Information
<b>Oberflächen- und Grenzflächen-Charakterisierungstechniken</b>	
Lichtmikroskopie	Mikrobielle Morphologie; Dicke und Dichte
Scanning-Electron-Microscopy (SEM)	Biofilmstruktur
Kombination von SEM und optischer Mikroskopie	Mikrostrukturelle Charakteristika von dünnen Biofilmen
Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	Quantifizierung von EPS durch die Messung des gesamten Zellvolumens In situ Darstellung der Biofilmstruktur
Scanning transmission X-ray Microscopy (STXM)	Darstellung der Verteilung von Makromolekülen in mikrobiellen Biofilmen Quantitative Analyse von Fe(II) und Fe(III); Ni(II); Mn(II)
AFM	Topographische Information
Cryoeinbettung und Schichtuntersuchungsmethoden	Interne Struktur; Dicke und Variabilität
Infrarot-Spektroskopie	Chemische Information
ATR-leaky mode spektroskopie	Beobachtung des Biofilmwachstums
Photoakustische Mikroskopie (PAS)	Tiefenauflösende Analyse von optisch und akustisch inhomogenen Medien, Bestimmung von Wachstum oder Ablösung über die Zeit
Röntgen-Spektroskopie	Strukturelle Information Speziation

**Tabelle 1** (Fortsetzung):

Methoden für die Biofilmmuntersuchung (nach Denkhaus et al. 2007)

Methode	Typ der gewonnenen Information
Reflexionsmikroskopie	Messung der Biofilmbildung
Mössbauer-Spektroskopie	Untersuchung von mikrobiellen-mineralischen Wechselwirkungen
Kern-Magnet-Resonanz (NMR)	Stoffwechsel, Hydrodynamische- und Massentransportphänomene
Separationstechniken	
Isolierung	Separation der EPS von Mikroorganismen
Field-flow Fraktionierung	Charakterisierung von natürlichen Kolloiden, Partikeln
	Bestimmung der Größenverteilung von Partikeln
Molekulare Techniken	Identifizierung von verschiedenen Bakterien eines natürlichen Biofilms
	Bestimmung der Genexpression
PCR Techniken - MALDI-TOF	Bestimmung der genetischen und phylogenetischen Eigenschaften auf subgenomischer Ebene
Chromatographische und elektrophoretische Methoden	
HPLC-Techniken (z. B.: HPAEC-PAD, HPLC-ESI-MS)	EPS, Mono-, Oligo- und Polysaccharide; Proteine
LC-FTICR-MS	Proteomanalyse
CE	Kohlenhydrate
2d-Gel-Elektrophorese – MALDI-TOF	Separation von Proteinen
GC-MS; GC-MS-MS	Kohlenhydratprofile von Bakterien, Fettsäuren
GC-MS	Identifizierung und Quantifizierung von Atrazin und Acetochlor
GC-Flame photometric detector (FPD)	Separation und Quantifizierung von Butyl-Zinn Verbindungen
Mikrosensoren	Bildung von Biofilmen, Zufluss und Abfluss
	Hygienische Aspekte
	Untersuchung des mikrobiellen Einflusses auf Korrosion (MIC)
Spektrometrische Methoden	
Fluoreszenz	Biomassequantifikation
	Mikrobielle Aktivität
Atom-Absorptions-Spektrometrie	Bestimmung von Schwermetallen und Nährstoffen
Total-Reflexions-Röntgen-Fluoreszenz-Spektrometrie	Bestimmung von Schwermetallen und Nährstoffen
Photospektrometrische Methoden	Bestimmung des Gesamtgehaltes an Kohlenhydraten und Proteinen
Elektrochemische Methoden	
Amperometrie	Bestimmung von Phosphat

**Tabelle 2:** Farbstoffe und Marker bei der mikroskopischen Analyse von Biofilmen (aus Strathmann 2003)

“Ziel“	Farbstoff / Markierung	Literaturauswahl
Polysaccharide, Glycokonjugate	Alcianblau	Wetzel et al. 1997, Karlyshev und Wren 2001
	Calcufluor White	Wood 1980, Sengbusch et al. 1982, Marshall 1992, Ramaswamy et al. 1997, Chandra et al. 2001, Kuhn et al. 2002
	Kongorot	Wood 1980, Allison und Sutherland 1984, Marshall 1992, Lawrence et al. 1998b
	Rutheniumrot	Guitierrez-Gonzalvez et al. 1987
	Fluoreszenz-markierte Lektine	Sizemore et al. 1990, Caldwell et al. 1982, Quintero und Weiner 1995, Hood und Schmidt 1996, Holloway und Cowen 1997, Neu und Lawrence 1997/1999a/b, Langille und Weiner 1998, Lawrence et al. 1998a, Johnsen et al. 2000, Neu et al. 2001, Wingender et al. 2001, Strathmann et al. 2002
	Peroxidase-markierte Lektine	Leriche et al. 2000, Strathmann et al. 2002
	biotinylierte Lektine	Sanford et al. 1995, Kawaguchi und Decho 2000
	Antikörper	Costerton et al. 1981, Weiner et al. 1995
Proteine	Hoechst 2495	Paul und Jeffrey 1985, Neu und Marshall 1991
	Nano Orange	Grossart et al. 2000 (Flagellen)
	Antikörper	Dazzo und Wright 1996
Nukleinsäuren (Zellen)	Acridin Orange	Wentland et al. 1996, Mattila et al. 1997, Van Ommen Kloeke und Geesey 1999
	DAPI	Huang et al. 1995, Van Ommen Kloeke und Geesey 1999, Espeland und Wetzel 2001
	SYTO-Farbstoffe	Mattila et al. 1997, Van Ommen Kloeke und Geesey 1999, Davey und O`Tool 2000 Strathmann et al. 2002
	Propidiumiodid	Van Ommen Kloeke und Geesey 1999, Davey und O`Tool 2000
	Gensonden	Wagner et al. 1994, Amann et al. 1995, Wagner und Amann 1997, Manz et al. 1999, Böckelmann et al. 2000, Davey und O`Tool 2000, Nielsen et al. 2000

**Tabelle 2** (Fortsetzung): Farbstoffe und Marker bei der mikroskopischen Analyse von Biofilmen (aus Strathmann 2003)

“Ziel“	Farbstoff / Markierung	Literaturauswahl
Lipide	Nilrot	Lamont et al. 1988
Enzymaktivität	CTC (5-Cyano-2,3-ditolyl-tetrazoliumchlorid)	Rodriguez et al. 1992, Schaule et al. 1993, Walsh et al. 1995, Wuertz et al. 1998
	INT	Chung und Neethling 1989, Kim et al. 1994, Walsh et al. 1995
	TTC	Ryssov-Nielsen 1975, Miksch 1985
	ELF-97-Substrat	Huang et al. 1993, Huang et al. 1998, Van Ommen Kloeke und Geesey 1999, Baty III et al. 2000/2001
Hydrophobe Bereiche	Nilrot	Lamont et al. 1988, Wolfaardt et al. 1994/1998
	hydrophobe, fluoreszierende Mikro-Kugeln	Zita und Hermansson 1997
pH-Wert	Carboxyfluorescein	Vroom et al. 1999
Gram-Färbung	BacLight Gram Stain	Wolfaardt et al. 1998, Karthikeyan et al. 1999
Permeabilität	fluoreszierende Dextrane	Korber et al. 1994, Lawrence et al. 1994, Birmingham et al. 1995, Wolfaardt et al. 1998
	fluoreszierende Mikro-Kugeln	Stoodley et al. 1994, Lawrence et al. 1998



### 1.1.2 EPS

Wie in 1.1 erwähnt, befinden sich die Mikroorganismen eines Biofilms meistens in einer Matrix aus EPS. Diese erfüllt mehrere Funktionen. Einerseits bestimmt sie maßgeblich die Architektur des Biofilms, andererseits hat sie auch funktionelle Wirkung (z. B.: Flemming und Wingender 2003b, Starkey et al, 2004, Allison 2003). Allgemeine Beispiele hierfür sind:

1. EPS hält den Biofilm zusammen
2. EPS schützt die Mikroorganismen vor schädlichen Einflüssen
3. EPS dient als Reservoir für Nährstoffe (oder Schadstoffe)
4. EPS dient als Reaktionsraum für Prozesse

Diese Matrix besteht hauptsächlich aus Kohlenhydraten (Polysacchariden), Proteinen, DNA und/oder Huminstoffen (siehe Tabelle 3) sowie eingelagerten Partikeln und Substanzen aus dem Medium. Allerdings kann die effektive EPS-Zusammensetzung stark von den angebotenen Nährstoffen (Quelas et al. 2006) und/oder von dem Substratum abhängen (z. B.: Gehrke et al. 2001). Der Zusammenhalt der Matrix resultiert aus verschiedenen Faktoren wie elektrostatische Wechselwirkungen (ionischen- oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen), Wasserstoffbrückenbindungen, sogenannter Entanglements (z. B.: Mayer et al. 1999; Wloka et al 2004) und/oder hydrophobe Wechselwirkungen (Zusammenlagerung hydrophober Substanzen).

Tabelle 3: EPS-Komponenten und deren Bestandteile (aus Wingender et al. 1999a)

Komponente	Untereinheiten	Bindungstypen	Struktur des Grundgerüsts	Substituenten (Beispiele)
Polysaccharide	Monosaccharide Uronsäuren Aminozucker	glykosidische Bindung	linear, verzweigt	Organisch: O-acetyl, N-acetyl, Succinyl, Pyruvyl Anorganisch: Sulfat, Phosphat
Proteine (Polypeptide)	Aminosäuren	Peptidbindung	linear	Oligosaccharide (Glycoproteine), Fettsäuren (Lipoproteine)
Nucleinsäuren	Nucleotide	Phosphodiesterbindung	linear	-
(Phospho)lipide	Fettsäuren Glycerin Phosphat Ethanolamin Serin Cholin Zucker	Esterbindung	Seitenketten	-
Huminstoffe	Phenole Einfache Zucker Aminosäuren	Etherbindungen C-C-Bindungen Peptidbindungen	vernetzt	-

Die EPS kann Mikroorganismen im Biofilm vor schädlichen Substanzen schützen. Dies lässt sich am Beispiel von Desinfektionsmitteln verdeutlichen. Diese müssen erst die Matrix durchdringen, ehe sie die Mikroorganismen erreichen. Hier können sterische und/oder elektrostatische Hemmnisse auftreten, oder die Desinfektionsmittel reagieren möglicherweise direkt mit der Matrix. Daher sind Mikroorganismen in einem Biofilm häufig besser gegen Desinfektionsmittel geschützt als planktonische Zellen (z. B.: Schulte et al. 2005, Loret et al. 2005). Viele der EPS-Bestandteile können geladene Komponenten enthalten (z. B.: saure Kohlenhydrate, Proteine, etc.). Aufgrund dieser Ladung können ionische Substanzen (z. B.: Schwermetalle) von der Matrix sorbiert werden. Die EPS kann aber auch Wasser zurückhalten und so die Mikroorganismen vor Austrocknung schützen (z. B.: Ophir und Gutnick 1994, Gorbushina 2007).

Da es sich bei Biofilmen selten um dichte Gebilde handelt, sondern diese mit Poren und Kanälen versehen sind, können Inhaltsstoffe des umgebenden Mediums (z. B.: Nährstoffe) auch zu tiefer gelegenen Bereichen gelangen. Diese Stoffe können ebenfalls in der Matrix sorbiert werden. Aufgrund der daraus resultierenden höheren Verweildauer ist es auch möglich, dass schwerer abbaubare Substanzen verwertet werden können (Flemming 2000). Die Matrix kann Exoenzyme akkumulieren, sodass sie nicht direkt weggeschwemmt werden und der Produzent dieser Exoenzyme die Produkte verwerten kann.

Betrachtet man die Bestandteile der EPS genauer, können einigen Komponenten Funktionen im Biofilm zugeordnet werden (siehe Tabelle 4). Es gibt Komponenten, die bevorzugt mit Oberflächen interagieren können. Dazu gehören die amphiphilen Substanzen. Diese wechselwirken mit hydrophoben oder hydrophilen Oberflächen und können sich dort anlagern (z. B.: Bildung eines Conditioning-Film (siehe 1.1)). Aber auch ein direkter Einfluss der EPS bezüglich der Anheftung von Bakterien an Oberflächen sowie eine Beschleunigung von Korrosionsprozessen von Oberflächen sind bekannt. Sand und Gehrke (2006) zeigten dies am Beispiel von *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Leptospirillum ferrooxidans* an metallhaltigen Oberflächen.

Andere Komponenten sind eher für die Struktur in den Biofilmen verantwortlich. Allerdings sind hier keine allgemeingültigen Aussagen möglich. Zum Beispiel können Biofilme reich an Kohlenhydraten sein (z. B. mucoide *P. aeruginosa*-Stämme (siehe 1.4.1.1.1)). Es gibt aber auch Biofilme, in denen Kohlenhydrate eine untergeordnete Rolle spielen (z. B.: Frølund et al. 1996). Je nach Gegebenheit können Kohlenhydrate, Proteine oder DNA die Struktur maßgeblich prägen.

Die extrazelluläre DNA kann an der Strukturgebung in den Biofilmen beteiligt sein aber auch dem horizontalen Gen-Transfer dienen (Vlassov et al. 2007).

Kohlenhydraten werden hauptsächlich strukturgebende Eigenschaften zugeordnet. Sie können aber als Nahrungsquelle oder in manchen Fällen als Pathogenitätsfaktor (z. B.: Alginat bei *P. aeruginosa*-infizierten Mucoviszidose-Patienten) fungieren. Durch ionische Substituenten können sie auch Sorptionsfunktionen aufweisen. Hier

kann schon die Abfolge der verschiedenen Monomere eine Rolle bei den Sorptionseigenschaften spielen (z. B.: Zheng et al. 1994).

Proteine können strukturgebende Eigenschaften aufweisen, als Nahrungsquelle oder auch als Pathogenitätsfaktor fungieren, besonders die Enzyme spielen hier eine Rolle. Bei Biofilmen handelt es sich selten um dichte Gebilde. Sie können mit Poren und Kanälen durchzogen sein. Da extrazelluläre Enzyme Polymere abbauen können, ist es wahrscheinlich, dass sie so den Biofilm in seiner Struktur beeinflussen. Es gibt eine Vielzahl von extrazellulären Enzymen. Eine Übersicht liefern hier Wingender und Jaeger (2002). Bei vielen Enzymen von pathogenen Bakterien handelt es sich um Pathogenitätsfaktoren. Bei *P. aeruginosa* sind als Pathogenitätsfaktoren zum Beispiel Enzyme wie Elastasen und andere Proteasen bekannt, aber auch Phospholipase C, Exotoxin A, Exotoxin U sowie Exoenzym S und Exoenzym Y wurden beschrieben (Delden 2004).

Zu den Proteinen gehören auch die Lektine. Dabei handelt es sich um zuckerbindende Proteine, die selektiv an Kohlenhydrate binden können. Mikroorganismen können sich anhand von Lektinen an die Zielstruktur der Lektine (Kohlenhydrate) anlagern (z. B.: Bismarck et al. 2001). Frei vorkommende Lektine können, falls sie mehrere Bindungsstellen aufweisen, auch Saccharide miteinander verknüpfen, (siehe 1.4.1.1.1 Abb. 7). Zum Beispiel Higgins und Novak (1997) untersuchten dies an Belebtschlammflocken. Bekannt sind solche Verknüpfungen auch aus dem medizinischen Bereich (z. B.: Minnick et al. 1986). Aufgrund dessen können Lektine Pathogenitätsfaktoren darstellen.

Tabelle 4: Funktionen von EPS-Komponenten (nach Flemming et al. 2007)

Effekt der EPS-Komponente	EPS-Komponente	Rolle im Biofilm
Konstruktiv	Neutrale Polysaccharide	Strukturgebende Komponente
	Amyloids	Strukturgebende Komponente
Sorptiv	Geladene oder hydrophobe Polysaccharide	Ionenaustausch, Sorption
Aktiv	Extrazelluläre Enzyme	Polymerabbau
Oberflächenaktiv	Amphiphile	Oberflächenwechselwirkung
	Membranvesikel	Export aus Zellen, Sorption
Informativ	Lektine	Spezifität, Erkennung
	Aminosäuren	Genetische Information, Struktur
Redox-aktiv	Bakterielle abbauresistente Polymere	Elektronen-Donor oder Akzeptor?
Nährstoff	Verschiedene Polymere	Quelle für C, N, P

## 1.2 EPS-Isolierung

Sollen die EPS-Komponenten untersucht werden, besteht die Möglichkeit sie von den Mikroorganismen der Biofilme zu trennen. Allerdings sind die Komponenten die man isolieren kann, abhängig von der Methode. Es gab (Flemming und Wingender 2002) und gibt bis heute keine Methode, die die EPS vollständig isolieren kann und die Zellen dabei nicht schädigt. Eine Vielzahl an Substanzen und Methoden kann für die Isolierung der EPS verwendet werden (siehe Tabelle 5 und 6), aber die Grundprinzipien sind sehr begrenzt. Allein durch mechanische Einwirkung von Scherkräften auf die Probe können EPS-Komponenten isoliert werden. Dabei kann es sich um Bewegung (Rühren, etc.) oder andere physikalische Kräfte (z. B. thermische) handeln. Sind die kohäsiven Kräfte der Matrix eher durch verbrückende Ionen bedingt, können Ionentauscher (z. B. Kationentauscher) oder Komplexbildner (z. B. EDTA) nützlich sein. Der Einsatz von reaktiven Chemikalien (z. B.: NaOH) oder Enzymen (z. B.: Wawrzynczyk et al. 2007) kann ebenfalls ein wirksames Mittel für die Isolierung von EPS-Komponenten sein. Hierbei werden aber häufig die Bestandteile modifiziert. Deshalb sind nur schwer Rückschlüsse auf die ursprünglichen Komponenten möglich (für eine Übersicht siehe Nielsen und Jahn 1999). Häufig ist das Isolierungsmedium wasserbasiert, sodass dann nur wasserlösliche EPS-Komponenten erfasst werden. In allen Fällen der EPS-Isolierung ist zu überprüfen, ob durch die Isolierungsmethode die Zellen geschädigt und so intrazelluläre Bestandteile freigesetzt werden. Hierfür stehen verschieden Methoden zur Verfügung. Es kann der zusätzliche DNA-Gehalt bestimmt werden (z. B.: Liu und Fang 2002) oder es besteht die Möglichkeit auf intrazelluläre Enzyme zu untersuchen (z. B.: Frølund et al. 1996). Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Änderung des ATP-Gehaltes zu bestimmen (Grotenhuis et al. 1991). Aber auch Untersuchungen der Veränderung in der Gesamtzellzahl und des physiologischen Zustandes wurden durchgeführt (z. B.: Frølund et al. 1996, Romani et al. 2008).

Tabelle 5: Isolierung von EPS aus Reinkulturen (Rode 2004 erweitert)

Reinkultur	Methode	Zelllysis	Literatur
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Zentrifugation (12.000 x g)	n. b.	Gehrke et al. (1998)
<i>Azospirillum brasilense</i>	Zentrifugation (5.000 – 10.000 x g)	n. b.	Troch et al. (1992)
<i>Bacteroides</i> sp.	Ethanol/Hochgeschwindigkeitszentrifugation	n. b.	Streeter et al. (1994)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	NaCl/ EDTA/ Mischen	n. b.	Junelles et al. (1989)
<i>Escherichia coli</i>	Pyridinacetat	n. b.	Pelkonen et al. (1988)
	Hexadecyltrimethylammoniumbromid/Erhitzen	n. b.	Schmidt und Jann (1982)
	NaOH	n. b.	Sato und Ose (1984)
	Hexadecyltrimethylammoniumbromid/Erhitzen	n. b.	Jann et al. (1980)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Dampf (Autoklavieren)	DNA	Azeredo et al. (1999)
	Ultraschall	Protein	Rudd et al (1982)
	Ultraschall; Hochgeschwindigkeitszentrifugation	Protein/DNA	Brown und Lester (1980)
<i>P. putida/ fluorescens</i>	Zentrifugation (5.000 – 13.000 x g)	n. b.	Conti et al. (1994)
	NaCl	n. b.	Read und Costerton (1987)
<i>Proteus vulgaris</i>	Erhitzen/Kochen	n. b.	Schmidt und Ahring (1994)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hochgeschwindigkeitszentrifugation (40.000 x g)	G6PDH	Wingender et al. (2001)
	NaCl	n. b.	May und Chakrabarty (1994)
	Hochgeschwindigkeitszentrifugation (20.000 – 48.000 x g)	n. b.	Buckmire (1984)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Zentrifugation (5.000 – 13.000 x g)	n. b.	Titus et al. (1995)
<i>Pseudomonas putida</i>	Behandlung mit Ionenaustauscherharz (Dowex)	G6PDH	Jahn und Nielsen (1995)
<i>Pseudomonas</i> sp. (Meer)	Ultrazentrifugation (113.000 x g)	n. b.	Wrangstadh et al. (1986)
<i>Pseudomonas</i> sp. NCMB 2021	NaCl	n. b.	Christensen et al. (1985)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Enzym (dispergierend)/ NaOH	n. b.	Tago und Aida (1977)
<i>Rhizobacteria</i>	NaOH/Erhitzen	n. b.	Hebbar et al. (1992)
<i>Rhizobium trifolii</i>	NaOH/Erhitzen	n. b.	Breeveld et al. (1990)
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	Ultra Turrax (20.000 U/min, 60 s); Cetyltrimethylammoniumbromid/Erhitzen; NaCl/Erhitzen	n. b.	Omar et al. (1983)
<i>Rhodopseudomonas acidophila</i>	EDTA/NaOH/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /Erhitzen/Zentrifugieren	DNA	Sheng et al. (2005)
Sedimentbakterium	EDTA/Mischen	G6PDH	Platt et al. (1985)
<i>Sphaerotilus natans</i>	deionisiertes Wasser / Mischen	n. b.	Gaudy und Wolfe (1962)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Ultraschall; Dampf (Autoklavieren); Glutaraldehyd; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; Tris/HCl; Dowex/Rühren	DNA	Azeredo et al. (1999)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NaCl/Ultraschall	n. b.	Evans et al. (1994)
Versch. Reinkulturen	Hochgeschwindigkeitszentrifugation (20.000 – 48.000 x g)	n. b.	Pavoni et al. (1972)
<i>Zoogloea</i>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /Mischen	n. b.	Farrah und Unz (1976)

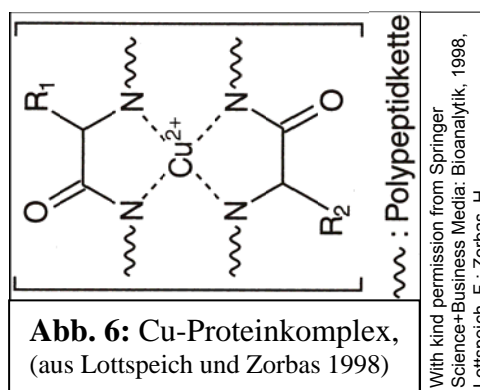
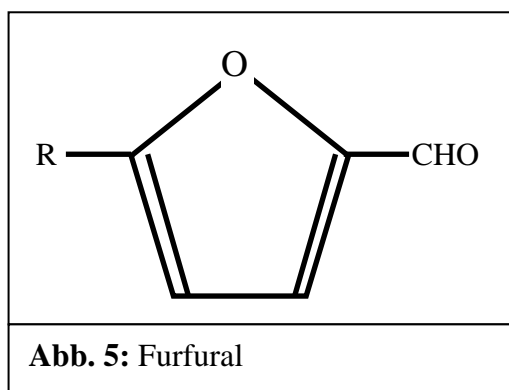
Tabelle 6: Isolierung von EPS aus Umweltproben (Rode 2004 erweitert)

Art des Biofilms	Methode	Zelllysis	Literatur
Abwasserbiofilm	Dowex/Rühren	G6PDH	Jahn und Nielsen (1995)
Abwasserschläm	Enzyme, Natrium-Triphosphat, Ionenaustauscher	n. b.	Wawrzynczyk et al. (2007)
	Phenol	Protein/PS-Verhältnis	Karapanagiotis et al. (1989)
Belebtschlamm	Verschieden Kationen-Austauschmethoden	n. b.	Park und Novak (2007)
	Zentrifugation (11.227 g); EDTA; Dampf; Formaldehyd	DNA	Jang et al. (2001)
	Kronenether	G6PDH	Wuertz et al. (2001)
	Tris/HCl; Glutaraldehyd; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; Ultraschall;	DNA	Azeredo et al. (1999)
	Ethanol/Hochgeschwindigkeitszentrifugation		
	Ethanol/Hochgeschwindigkeitszentrifugation	G6PDH	Frølund et al. (1996)
	Ultraschall	DNA/Zellzahl	Jorand et al. (1995)
	Ultraschall	n. b.	Quarmby und Forster (1995)
	Ultraschall	n. b.	Urbain et al. (1993)
	Ultraschall	n. b.	King und Forster (1990)
	Erhitzen/Kochen	n. b.	Morgan et al. (1990)
	Dampf (Autoklavieren)	Protein/PS-Verhältnis	Karapanagiotis et al. (1989)
	Filtration; Dampf (Autoklavieren)	n. b.	Hejzlar und Chudoba (1986)
	Ethanol-Ausfällung	n. b.	Forster und Clarke (1983)
	Zentrifugation (5.000 – 13.000 x g); K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	DNA	Gehr und Henry, (1983)
	Dowex (Ionenaustauscher)/Formaldehyd	n. b.	Rudd et al. (1983)
	Erhitzen/Kochen	n. b.	Beccari et al. (1980)
	Dampf (Autoklavieren); NaOH; Ultraschall	Protein/DNA	Brown und Lester (1980)
	NaOH; NH <sub>4</sub> OH/EDTA	n. b.	Sato und Ose (1984)
Eulitorale Sedimente	NaCl, EDTA/Mischen	n. b.	Underwood et al. (1995)
Faul-/Belebtschlamm	Hochgeschwindigkeitszentrifugation (20.000 – 48.000 x g); Formaldehyd;	DNA	Liu und Fang (2002)
	Formaldehyd/NaOH; Dowex/Rühren; EDTA/Mischen; Formaldehyd/Ultraschall		
Faulschlamm	Erhitzen/Kochen	n. b.	Forster und Quarmby (1995)
	NaCl/Formaldehyd/ Ultraschall	n. b.	Jia et al. (1996)
	Erhitzen/Kochen	n. b.	Horan und Eccles (1986)
Faulschlamm/Granula	Erhitzen/Kochen	Protein/DNA	Brown und Lester (1980)
Frischwasser/Meer-Isolate	Hochgeschwindigkeitszentrifugation (20.000 – 48.000 x g)	n. b.	Kennedy und Sutherland (1987)
Klärschlamm	Dowex; NaOH	Protein/PS-Verhältnis	Karapanagiotis et al. (1989)
Marine Bakterien	EDTA	n. b.	Labare et al. (1989)
Methanogene Granula	Phenol/Ultraschall	n. b.	Veiga et al. (1997)
UASB Granulat	Ultraschall	n. b.	Rahman et al. (1997)
Extrem saure Biofilme	NaCl 80 °C; MilliQ water 30 °C; EDTA; Dowex; Kronenether	G6PDH	Aguilera et al. (2008)

### 1.3 EPS-Charakterisierung

Wie in 1.2 beschrieben, können die EPS für die Charakterisierung isoliert werden. Sind diese erst einmal isoliert, richtet sich das Interesse auf die Charakterisierung. Hier gibt es unterschiedliche Ansätze. Um eine Übersicht über die Zusammensetzung der isolierten EPS zu erhalten, können Summenparameter bestimmt werden. Hierbei handelt es sich um die Analytik der isolierten EPS in Bezug auf einen Anteil. Gängig und in dieser Arbeit angewendet wurde die Untersuchung der Gesamtkohlenhydrate, Proteine, Huminstoffe und DNA.

Die Kohlenhydrate können nach Dubois et al. (1956) quantifiziert werden. Hierbei werden die Kohlenhydrate mit Schwefelsäure total hydrolysiert. Unter Wasserabspaltung reagiert das Kohlenhydrat (Saccharid) zu einem Furfural (heterozyklisches Aldehyd, siehe Abb. 5). Von Robyt (1998) wurde der Reaktionsmechanismus exemplarisch für D-Glucopyranose gezeigt. In einer Kondensationsreaktion kann sich dann Phenol an das Furfural anlagern. Daraus ergibt sich eine charakteristische Färbung, die sich photometrisch bestimmen lässt. Allerdings kann die Absorption der verschiedenen Kohlenhydrat-Monomere unterschiedlich ausfallen (z. B.: Rao und Pattabiraman 1989, 1990). Als Referenz für Umweltproben wird häufig Glucose verwendet (z. B.: Aguilera et al. 2008, Wawrzynczyk et al. 2007, Liu und Fang 2002). Nach Sutherland (2001) ist Glucose in der Umwelt weit verbreitet. Glucose kommt in Cellulose vor, was eines der am häufigsten auf der Welt vorkommenden Biopolymere ist. Die Kohlenhydrate lassen sich auch in ihren Eigenschaften unterscheiden. Uronsäuren (saure Kohlenhydrate) können nach Filsetti-Cozzi und Carpita (1991) ohne störenden Einfluss von neutralen Zuckern bestimmt werden.



Der Proteingehalt wird häufig nach der Lowry-Methode (Lowry et al. 1951) bestimmt. Hierbei wird zweiwertiges Kupfer ( $\text{Cu}^{2+}$ ) von Proteinen komplexiert (Biuret-Reaktion, siehe Abb. 6) und es kommt zu einer Färbung (Kretschmayer und Jesserer 1943). Durch die Zugabe von Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz lassen sich dann auch geringere Mengen an Protein nachweisen (z. B.: Wu 1922). Bei der Lowry-Methode reagieren die Proteine zuerst mit  $\text{Cu}^{2+}$ , wobei anschließend durch die Wechselwirkung von Phosphomolybdat-Phosphowolframsäure und dem Kupfer-

Proteinkomplex die messbare Färbung entsteht. Bei der Proteinanalytik nach Lowry können Huminstoffe störende Effekte hervorrufen. Diese Störung kann durch Modifizierung des Testes kompensiert werden. Hierfür wird die Probe mit und ohne  $\text{Cu}^{2+}$ -Zugabe gemessen und die Messwerte werden miteinander verrechnet (Frølund et al. 1995).

Der DNA-Gehalt einer Probe lässt sich mittels fluoreszierender DNA-bindender Farbstoffe quantifizieren. DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid) beispielsweise bindet an A-T-reiche Regionen der kleinen Furche bei DNA oder kann in A-U-reiche Regionen der RNA interkalieren (Tanious et al. 1992). Anhand von Referenzmessungen lässt sich der DNA-Gehalt in einer Probe bestimmen. Es ist zu überprüfen, ob die Probe Eigenfluoreszenz aufweist (vgl. 1.1.1). Eine Methode hierfür wurde von Brunk et al. (1979) beschrieben.

Es gibt noch eine Vielzahl weiterer Methoden um EPS-Komponenten zu charakterisieren und zu analysieren (z. B.: Wingender et al. 1999b).

Es besteht aber auch die Möglichkeit, einzelne Komponenten (z. B.: Kohlenhydrate, Proteine) näher zu untersuchen. Dazu ist es aber erforderlich, die zu analysierende Komponente (z. B.: Kohlenhydrate) weiter aufzutrennen, um die Fraktionen der einzelnen Bestandteile (z. B.: verschiedene Polysaccharide) der Analytik zuzuführen. Zu Beispiel lassen sich geladene Komponenten durch Gel-Elektrophorese auftrennen (z. B.: Broekman 2007). Durch Affinitätschromatographie (z. B.: Rode 2004) lassen sich Komponenten aufgrund ihrer Stoffeigenschaften oder mit der Permeationschromatographie (z. B.: Schultheis et al. 2008) anhand ihrer Größe voneinander trennen.

In der Analytik sind zurzeit deutliche Fortschritte im Bereich der Massenspektrometrie erkennbar. Um die Proben zugänglich zu machen, werden hauptsächlich 2 Methoden verwendet. Dabei handelt es sich um die Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) und um die Electronspray-ionisation (ESI). Bei der MALDI wird die Probe in eine Matrix eingebettet. Durch Laserimpulse werden Probe und Matrix in die Gasphase überführt und durch eine angelegte Spannung und Stoßprozesse ionisiert. Bei der ESI wird die Lösung des Analyten bei Atmosphärendruck aus einer Kapillaren in ein starkes elektrisches Feld versprüht. Hierbei wird die Lösung ionisiert. Anhand der Flugzeit-Massenspektroskopie (time of flight = tof) kann anhand des Verhältnisses Masse/Ladung differenziert werden. Mit der Massenspektrometrie können sowohl Proteine (z. B.: Cañas et al. 2006) als auch Kohlenhydrate (z. B.: Volpi 2007) analysiert werden. Die Proteine lassen sich so identifizieren und im Idealfall ist mit diesen Methoden auch der Aufbau von polymeren Kohlenhydraten erkennbar.

Aber auch mit anderen Methoden können wichtige Informationen gewonnen werden, allerdings eignen sich diese eher für die Kohlenhydratanalytik (Monomere oder Dimere). Mit den folgenden Methoden lassen sich komplexe Polymere nur schlecht analysieren. Außerdem werden für diese Methoden teilweise größere Mengen an Probenmaterial benötigt (im Milligrammbereich oder noch mehr). Mit der Infrarot-Spektroskopie (IR) können Feststoffe analysiert werden (z. B.: Vincente-Garcia et al.



2004). Infrarot-Spektroskopie mit wassergelösten Proben ist häufig, aufgrund des Lösemittels Wasser (O-H-Schwingung), für die EPS-Analytik ungeeignet. Des Weiteren können die Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) (z. B.: Verhoef et al. 2005), die Magnet-Resonanz-Spektroskopie (NMR) (z. B.: Schürks et al. 2002) oder die Raman-Spektroskopie für die EPS-Analytik von Nutzen sein. Auch die Gas-Chromatographie (z. B.: Sand und Gehrke 1999) mit einem Detektionssystem (idealerweise Massenspektrometer) lässt sich für die EPS-Analytik verwenden. Huminstoffe lassen sich durch das LC-OCD Verfahren (Flüssigkeitchromatographie mit Organischem-Kohlenstoff-Detektor) charakterisieren (z. B.: Huber 2005).

Die Analytik von Proteinen wird häufig mit anderen Methoden durchgeführt. Proteine können über die 2-D-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Färbung sichtbar gemacht werden. Die einzelnen Proteine lassen sich dann über massenspektrometrische Methoden weiter analysieren (z. B.: Broekman 2007). Enzyme (extrazellulär oder intrazellulär) lassen sich qualitativ und quantitativ über verschiedene Methoden untersuchen. Eine Übersicht liefern hier Wingender und Jäger (2002).

Es gibt aber auch Möglichkeiten, EPS-Komponenten im Biofilm zerstörungsfrei zu untersuchen. Zum Beispiel können mit der ATR (abgeschwächte total Reflexion) Untersuchungen in-situ an der Aufwuchsoberfläche des Biofilms durchgeführt werden (z. B.: Omoike and Chorover 2004). Hierbei lassen sich auch relative Unterschiede im Zeitverlauf erkennen. Mit der konfokalen Ramanmikrospektroskopie lässt sich die räumliche Verteilung der EPS untersuchen (siehe 1.1.1.). Durch Anfärbung von EPS-Komponenten (siehe Tabelle 2) und anschließender mikroskopischer Betrachtung lassen sich ebenfalls Informationen gewinnen. Kohlenhydrate kann man mit fluoreszenzmarkierten Proteinen (Lektinen) sichtbar machen (z. B.: Neu und Lawrence 1999a) und Proteine können mit verschiedenen Farbstoffen versehen werden (z. B.: Larsen et al. 2008). Enzyme lassen sich durch Umsetzung von bestimmten Substraten nachweisen. Zum Beispiel Tielen (2005) visualisierte Lipaseaktivität mittels ELF-97 Palmitat. Francoeur et al. (2001) untersuchten Proteaseaktivität anhand lektin gebundener Fluorochrome an Cellulose.

## **1.4 Trinkwasser**

Das Wasser, welches zu Trinkwasser aufbereitet werden kann, ist begrenzt. Der größte Teil der Erde (ca. 81 %) ist zwar mit Wasser bedeckt, aber nur ein kleiner Teil davon ist "Süßwasser". Das salzhaltige Meerwasser (ca. 97 %) ist lediglich nach aufwändiger Aufbereitung (Meerwasserentsalzung durch Umkehrosmose) als Trinkwasser zu verwenden. Nur ca. 3 % der Wasservorräte sind Süßwasser und davon liegen ca. 2/3 als Eis vor. Nur ca. 1 % der weltweiten Wasservorräte ist also überhaupt für die Trinkwasseraufbereitung zugänglich.

In Deutschland wird Trinkwasser zu 2/3 unmittelbar aus Grundwasser und zu 1/3 mittelbar aus Oberflächenwasser gewonnen und fast ausschließlich durch zentrale Wasserversorger verteilt. Um Wasser als Trinkwasser zu verwenden, müssen in Deutschland bestimmte Kriterien erfüllt werden. Die "Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch" wird von der Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) geregelt. Trinkwasser ist nach § 3 TrinkwV "alles Wasser, im ursprünglichen Zustand oder nach Aufbereitung zum Trinken, zum Kochen, zur Zubereitung von Speisen und Getränken oder insbesondere zu folgenden anderen häuslichen Zwecken bestimmt ist:

- Körperpflege und -reinigung
- Reinigung von Gegenständen, die bestimmungsgemäß mit Lebensmitteln in Berührung kommen
- Reinigung von Gegenständen, die bestimmungsgemäß nicht nur vorübergehend mit dem menschlichen Körper in Kontakt kommen

Dies gilt ungeachtet der Herkunft des Wassers, seines Aggregatzustandes und ungeachtet dessen, ob es für die Bereitstellung auf Leitungswegen, in Tankfahrzeugen, in Flaschen oder anderen Behältnissen bestimmt ist."

§ 4 der TrinkwV fordert: "Wasser für den menschlichen Gebrauch muss frei von Krankheitserregern, genusstauglich und rein sein."

§ 5 der TrinkwV besagt: "Im Wasser für den menschlichen Gebrauch dürfen Krankheitserreger im Sinne des § 2 Nr. 1 des Infektionsschutzgesetzes nicht in Konzentrationen enthalten sein, die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen.

Im Wasser für den menschlichen Gebrauch dürfen die in Anlage 1 Teil I festgesetzten Grenzwerte für mikrobiologische Parameter nicht überschritten werden."

In Anlage 1 Teil I sind die Grenzwerte für *E. coli*, Enterokokken und coliforme Bakterien mit 0/100 ml angegeben. Diese Indikatororganismen dienen zur Überprüfung der Wasseraufbereitung und des Verteilungssystems. Sollten sie nachgewiesen werden, ist dies ein Hinweis auf Störungen im System und eine Gesundheitsgefahr kann nicht ausgeschlossen werden.

### 1.4.1 Pathogene Mikroorganismen im Trinkwasser

Es gibt Krankheitserreger, die sich in aquatischer Umgebung (natürlich oder künstlich) halten und sogar vermehren können. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass sich über das Wasser Krankheiten verbreiten. Typische Krankheitserreger wie *Salmonella enterica* (Typhus), *Vibrio cholerae* (Cholera) oder *Shigella* spp. (Shigellose), die sich durch Wasser verbreiten können, gelten allerdings aufgrund des heutigen Standes der Trinkwasseraufbereitung in den meisten technisierten Ländern sehr selten als Ursache für trinkwasserbedingte Erkrankungen. Sie treten nur selten im Trinkwasser in Erscheinung und wenn, dann meist in Zusammenhang mit Störungen in der Trinkwasseraufbereitung oder im Verteilungsnetz. Allerdings sind in den letzten Jahren sogenannte “emerging pathogens“ immer mehr in den Vordergrund gerückt. Hierbei handelt es sich keineswegs ausschließlich um “neue“ Krankheitserreger, vielmehr sind diese erst durch Fortschritte in der Nachweisttechnik erkannt und identifiziert worden. Dazu gehören aus fäkalen Quellen stammende Bakterien wie *Campylobacter jejuni*, pathogene *Escherichia coli* und *Yersinia enterocolitica* und aus fäkalen Quellen stammende Viren wie Rotaviren, Caliciviren und Astroviren. Aber auch aus fäkalen Quellen stammende Parasiten wie *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* und Microsporidien zählen dazu. Andererseits sind auch Umweltbakterien, die sich in wasserführenden Systemen halten und/oder vermehren können, identifiziert worden. Hierzu gehören *Legionella* spp., *Aeromonas* spp., *Mycobacterium* spp. und *Pseudomonas aeruginosa* (Szewzyk et al. 2000). Eine Meldepflicht von Erkrankungen bezüglich ihres Ursprungs (Lebensmittel, Wasser etc.) existiert in Deutschland nicht.

#### 1.4.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* gehört zu den “emerging pathogens“ und wird in Krankenhäusern zu einem der gefährlichsten Krankheitserreger gezählt. Er ist ein ubiquitär vorkommendes Bakterium, das sich aufgrund geringer Nährstoffansprüche an vielen Standorten finden lässt. Es ist seit 1862 bekannt und wurde 1882 erstmals isoliert. Bis zu 12% der gesunden Normalbevölkerung können fäkale Träger von *P. aeruginosa* sein (Dalhoff 1987).

*P. aeruginosa* ist ein Gram-negatives, polar begeißeltes, stäbchenförmiges Bakterium, das Pigmente (Pyocyanin, Pyoverdin und Pyorubin) produzieren kann. Pyocyanin ist einer der Pathogenitätsfaktoren von *P. aeruginosa*. Pyocyanin kann unter aeroben Bedingungen enzymatisch NADH oxidieren und so die Bildung von Sauerstoffradikalen katalysieren (O'Malley et al. 2004). Weitere Pathogenitätsfaktoren sind Exotoxine, Proteasen und Rhamnolipide (Döring 1987). Weitere Studien zeigten ein vielfältigeres Spektrum an Pathogenitätsfaktoren (Delden 2004).

*P. aeruginosa* ist einer der am häufigsten untersuchten Mikroorganismen. In einer Vielzahl von Studien wurde die Biofilmbildung untersucht (z. B.: Wagner und Iglewski

2008, Ryder et al. 2007, Sauer et al. 2002, Boyd und Chakrabarty 1995) und es gibt eine vollständige Genomsequenzierung des Stammes PAO1 (Stover et al. 2000). Das *P. aeruginosa* zusammen mit anderen Mikroorganismen in Biofilmen nachgewiesen werden kann, wurde in verschiedenen Untersuchungen gezeigt. Zum Beispiel Anderson et al. (2008) zeigten, dass in einem Biofilm aus 13 verschiedenen Mikroorganismen *P. aeruginosa* einer der dominanten Organismen war. *P. aeruginosa* war in der Lage, mit jedem der 12 anderen Organismen Biofilme zu bilden. Von Al-Bakri et al. (2004) wurde nachgewiesen, dass es *P. aeruginosa* möglich war, gemeinsam mit *Burkholderia cepacia* in Biofilmen zu wachsen. Stewart et al. (1997) wiesen gemischte Biofilme aus *Klebsiella pneumoniae* und *P. aeruginosa* nach.

Bei *P. aeruginosa* handelt es sich um einen opportunistischen Krankheitserreger, der hauptsächlich immunsupprimierte Menschen befällt. In Krankenhäusern ist er für einen erheblichen Teil der nosokomialen Infektionen (Infektionen, die im Krankenhaus erworben werden) verantwortlich (z. B. Carmeli 2008). Er kann Pneumonie (Lungenentzündung), nekrotisierenden Otitis (Gehörgangsentzündung), Wundinfektionen (häufig bei Verbrennungswunden), Sepsis (Blutvergiftung), Keratitis (Hornhautentzündung) bei Kontaktlinsenträgern, Harnwegsinfektionen, Endokarditis (Herzinnenhautentzündung) und sehr selten Meningitis (Hirnhautentzündung) verursachen.

Ein besonderes Problem stellt *P. aeruginosa* bei Menschen mit cystischer Fibrose (CF) da. Hier ist bekannt, dass er in der Lage ist, sich in Biofilmen der Lunge einzunisten und dort zu persistieren (z. B.: Donaldson und Boucher 2003, Prince 1992, Gilligan 1991).

Ein weiteres Problem bei Infektionen mit Bakterien ist die Resistenzausbildung gegen Antibiotika. Sollte ein Bakterium gegen mehrere Antibiotika resistent sein, spricht man von einer Multiresistenz. Eine Untersuchung in Schweden an 2 Krankenhäusern zeigte, dass ca. 2,7 % aller untersuchten klinischen *P. aeruginosa*-Isolate gegen mehr als ein Antibiotikum resistent waren (Wimmerstedt und Kahlmeter 2008). Eine andere Untersuchung in Schweden ergab, dass es in den Jahren von 2003 bis 2006 keine deutliche Zunahme an resistenten *P. aeruginosa*-Isolate gegeben hat (Swedres 2006).

In einer Meta-Studie im Zeitraum von 1966 bis 2005 zeigte sich, dass je nach Land 0,6 – 32% der klinischen Isolate multiresistent waren (Obritsch et al 2005).

*P. aeruginosa* ist in Deutschland kein meldepflichtiger Krankheitserreger. Daher ist eine Abschätzung der Inzidenz schwierig, aber es kommt immer wieder zu Krankheitsausbrüchen (z. B.: Eckmanns et al. 2008, Panknin 2005). Auch international wird öfter von Krankheitsausbrüchen berichtet (z. B.: Moolenaar et al. 2000 USA, Iversen et al. 2007 Norwegen, Gupta et al. 1993 Indien, Kirschke et al. 2003 USA, Al-Mobeireek et al. 1998 Saudi-Arabien). Eine weltweite Erfassung der nosokomialen Erkrankungen ist nicht gegeben.

In den USA werden Krankheitsausbrüche durch *P. aeruginosa* im Freizeitbereich (Badewasser) durch die CDC (Centers for Disease Control and Prevention)

überwacht. In den Jahren 2003 – 2004 wurden 8 Fälle mit 274 Erkrankten erfasst (Dziuban et al. 2006). Es handelte sich in allen Fällen um Spa-Einrichtungen.

Im Trinkwasserbereich sind sehr wenige Daten über *P. aeruginosa*-Kontaminationen vorhanden. Es gibt ausschließlich Einzelfallmeldungen (z. B.: Schauer und Hasselwander 2008 Deutschland, Behrends 2003 Deutschland, Schwenk 2002 Deutschland, Chaidez et al. 2008 Mexico, September et al. 2007 Süd-Afrika). Eine Untersuchung in deutschen Hausinstallationen zeigt, dass von 173 beprobten Installationen 11 mit *P. aeruginosa* belastet waren (Wricke et al. 2007). Zamberlan da Silva et al. (2008) konnten innerhalb einer Studie in Brasilien zeigen, dass *P. aeruginosa*-Isolate aus Trinkwasser noch Pathogenitätsfaktoren aufwiesen.

#### 1.4.1.1.1 EPS von *P. aeruginosa*

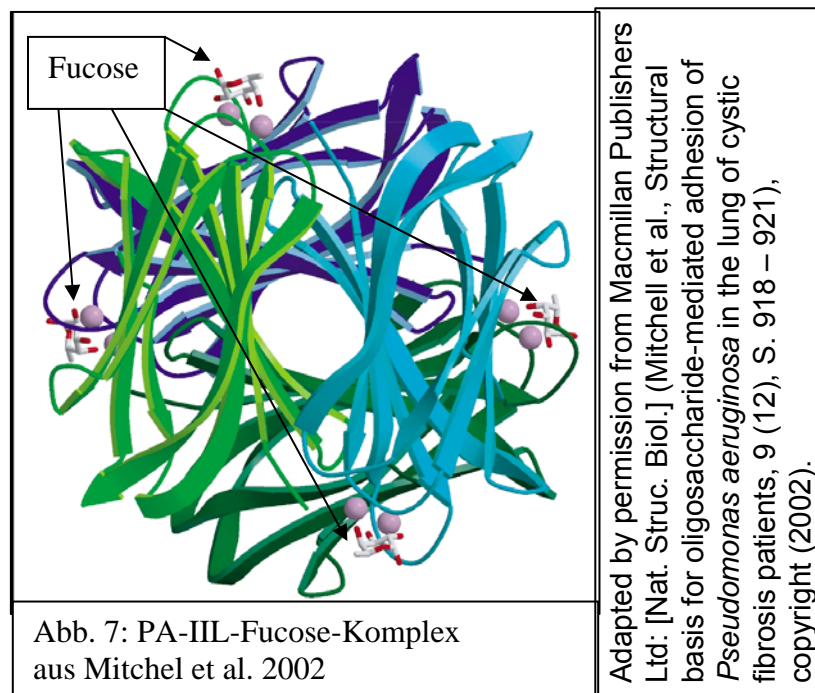
*P. aeruginosa* kann EPS produzieren. Die Zusammensetzung der EPS kann sich aber von Stamm zu Stamm stark unterscheiden. Grob lassen sich die Stämme in mucoid (allgemein: schleimbildend, bei *P. aeruginosa* beinhaltet es die Alginatbildung) und nicht-mucoid Stämme unterscheiden.

Für kohlenhydrathaltige EPS-Komponenten ist bekannt, dass es Stämme gibt, die in der Lage sind, große Alginatmengen (Polysaccharid) zu produzieren (z. B.: Wingender et al. 2001; Nivens et al. 2001). Diese werden mucoid genannt. Zum Beispiel besteht Alginat von *P. aeruginosa* SG81 hauptsächlich aus den Uronsäuren Mannuronat und Guluronat (Schürks et al. 2002). Des Weiteren kann die EPS auch noch geringe Mengen anderer Kohlenhydrate und Protein aufweisen (Grobe et al. 1995). Das *P. aeruginosa* FRD1 Alginat produzieren kann, wurde von Ohman und Chakrabarty (1981) beschrieben. Bei anderen nicht-mucoiden Stämmen spielt Alginat keine bedeutende Rolle in den EPS (z. B.: PAO1 oder PA14 (Wozniak et al. 2003)). PA14 kann glucosereiche EPS-Komponenten produzieren. Hierfür wird der *pel*-Gen-Cluster verantwortlich gemacht (Friedman und Kolter 2004a). Bei *P. aeruginosa* ZK2870 wurde der *psl*-Gen-Cluster als ausschlaggebend für mannosereiche EPS-Komponenten identifiziert (Friedman und Kolter 2004b). PAO1 kann DNA-reiche EPS produzieren (Whitchurch et al. 2002). Bei PAO1 ist der *psl*-Gen-Cluster auch für mannosereiche EPS-Komponenten verantwortlich. PAO1 ohne den *psl*-Gen-Cluster weist hauptsächlich Glucose und Rhamnose in den EPS auf (Matsukawa und Greenberg 2004), wobei allerdings die effektive EPS-Zusammensetzung stark von den angebotenen Nährstoffen abhängen kann (siehe 1.1.2).

Extrazelluläre Proteine bei *P. aeruginosa* sind vielfältig. Eine Untersuchung an *P. aeruginosa* SG81 zeigte über 100 diskrete Proteinspots in der 2-D-Gelelektrophorese (Broekman 2007). Bei PAO1 wurden extrazelluläre Proteine in Flüssigkultur untersucht. Auch hier wurde eine Vielzahl an verschiedenen Proteinen gefunden (Nouwens et al. 2003). In diesen Untersuchungen wurden Chitinasen, Dehydrogenasen, Esterasen, Lipasen, etc. identifiziert. Extrazelluläre Enzyme

können bei *P. aeruginosa* ein Pathogenitätsfaktor sein (z. B.: Jäger 1994, siehe 1.4.1.1).

*P. aeruginosa* kann ebenfalls Lektine produzieren. Bei Lektinen handelt es sich um zuckerbindende Proteine. Für *P. aeruginosa* sind die Lektine LecA (PA-IL) und LecB (PA-IIL), bekannt, wobei LecA  $\alpha$ -D-Galactose (Gilboa-Garber 1982) und LecB L-Fucose als Zielzucker bevorzugt (Garber et al. 1987). Die Bindung des Lektins PA-IIL (LecB) an den Zielzucker Fucose ist in Abb. 7 dargestellt. Die Bindungsspezifität kann von Lektin zu Lektin variieren (z. B.: Strathmann 2002). Untersuchungen zeigten, dass Lektine wie LecA (Diggle et al. 2006) oder LecB (Tielker et al. 2005) auch an der Biofilmbildung beteiligt sein können. PAO1 hat genetisch die Anlagen beide Lektine zu produzieren. Bei PAO1 ist das Lektin LecB an der äußeren Membran lokalisiert (Tielker et al. 2005). Da LecB sich an der äußeren Membran befinden kann, besteht die Möglichkeit, dass sich *P. aeruginosa* anhand des Lektins an Biofilmkomponenten anlagern kann.



## 1.5 Nachweis von *P. aeruginosa*

### 1.5.1 Nachweis von *P. aeruginosa* nach DIN

*P. aeruginosa* wird im Wasserbereich nach einem genormten Kultivierungsverfahren, der DIN EN ISO 16266 (Jahr 2008), identifiziert.

Hiernach sind *P. aeruginosa* definiert als:

“Mikroorganismen, die auf selektiven, cetrimidhaltigen Nährmedien wachsen und Pyocyanin produzieren, oder Mikroorganismen, die auf selektiven, cetrimidhaltigen Nährmedien wachsen, Oxidase-positiv sind, unter UV-Licht ( $360 \pm 20$  nm) fluoreszieren und aus Acetamid Ammoniak bilden können.“

Nach DIN EN ISO 16266 wird "Pseudomonas Selektivagar/CN-Agar" als Anzuchtmedium verwendet.

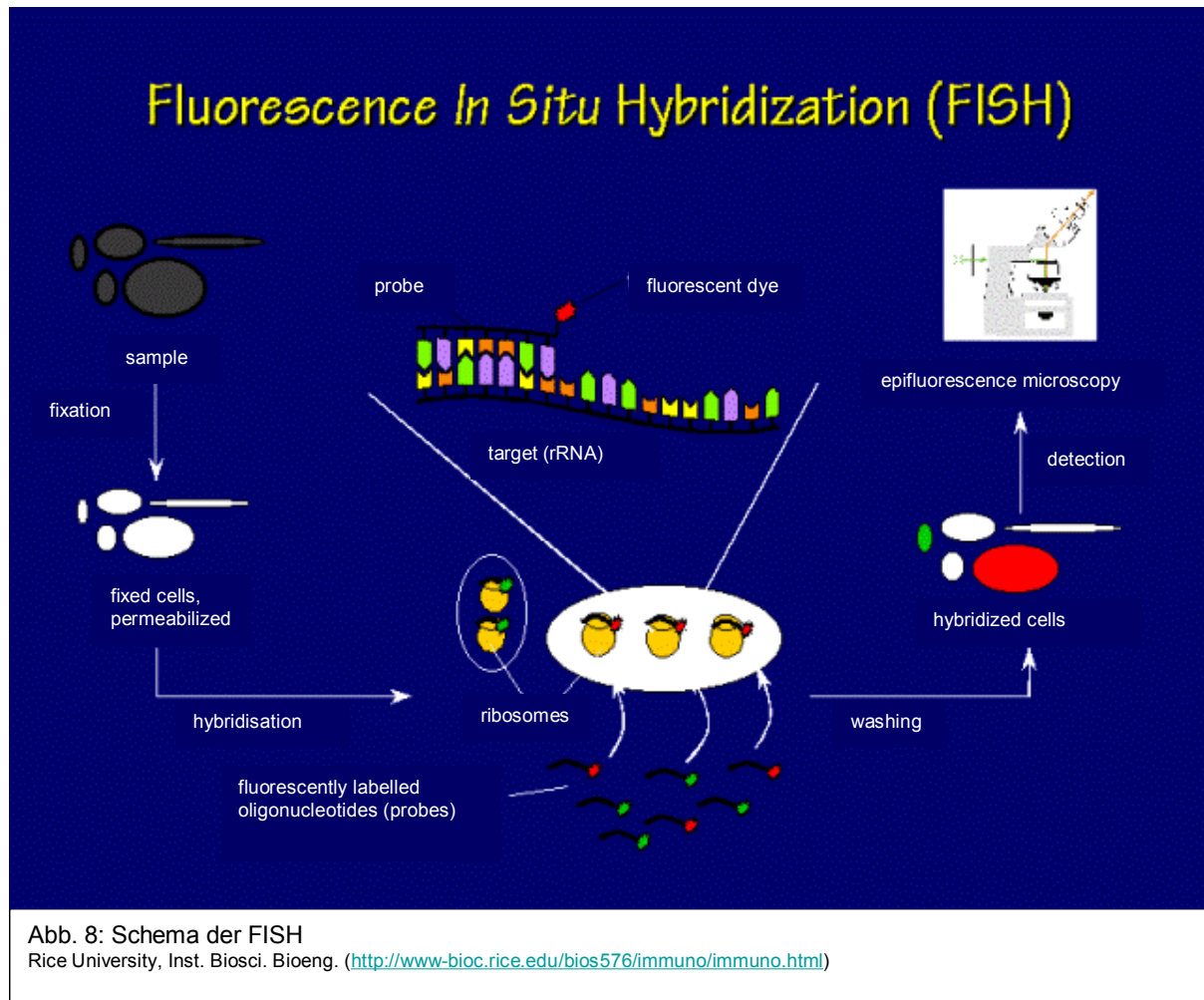
### 1.5.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die FISH kann als Mittel verwendet werden, um Bakterienarten wie *P. aeruginosa* kultivierungsunabhängig nachzuweisen. Hierzu werden Oligonucleotidsequenzen, die spezifisch für das Ziel sind, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (Sonden). Meistens werden rRNA-Sequenzen als Ziel gewählt. Um die Sonden in die Zellen einzuschleusen, müssen diese vorbehandelt werden. Häufig werden hierfür die Zellen zuerst in Aldehydlösungen (Paraformaldehyd oder Formaldehyd) fixiert und dann ethanolisch denaturiert. Eine schematische Darstellung der FISH-Prozedur ist in Abb. 8 dargestellt. Das Protokoll muss immer an die Probe angepasst und gegebenenfalls modifiziert werden. Um bei Gram-positiven Zellen die Zellwand zu permeabilisieren, wird häufig eine Lysozymbehandlung verwendet, die aber auch bei Gram-negativen Zellen eine Verbesserung der Sondendiffusion bewirken kann.

Die eigentliche Hybridisierung wird in einem Puffer durchgeführt, welcher aus einwertigen Salzen und einem Puffersystem nahe pH 7 besteht. Die wichtigste Information, die benötigt wird, ist die Dissoziationstemperatur der Sonde. Diese ist abhängig vom Anteil der G / C / A / T -Nukleotide (Aminosäuren). Es besteht die Möglichkeit, die Dissoziationstemperatur anhand von Formeln abzuschätzen.

Die Hybridisierungstemperatur kann durch die Zugabe von Formamid abgesenkt werden. Hierdurch lässt sich die Hybridisierung bei schonenderen Temperaturen durchführen. Nach der Hybridisierung wird die Probe gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen (Amann und Schleifer 2005).

In der Literatur sind mehrere Sonden für *P. aeruginosa* beschrieben (z. B.: Wellinghausen et al. 2005, Kempf et al. 2000, Hogardt et al. 2000).



## 1.6 Biofilme in Trinkwasserverteilungssystemen und ihre Rolle als Habitat für hygienisch relevante Mikroorganismen

Wie bereits erwähnt (siehe 1.1.) werden Biofilme als ubiquitär angesehen. Daher ist es wenig verwunderlich, dass sie auch in Trinkwasserverteilungssystemen nachgewiesen werden konnten (z. B.: Berry et al. 2006, Långmark et al. 2005a/b, Flemming et al. 2002). Es kann sich dabei um dünne, unregelmäßige Beläge handeln (z. B.: Pedersen 1990) oder aber auch um flächendeckende Beläge (z. B.: Grubert et al. 1992). Hier stellt sich die Frage, ob und inwieweit diese Biofilme von hygienisch relevanten Mikroorganismen besiedelt sind oder werden können. Als hygienisch relevante Mikroorganismen gelten Mikroorganismen mit pathogenem Potential (siehe 1.4.1) oder solche, die als Indikator für mögliche Kontaminationen gelten (siehe 1.4).

In einer Studie in Deutschland (Flemming 2003) wurden Trinkwasserverteilungssysteme mikrobiologisch charakterisiert. Dabei konnten Wingender et al. (2003) zeigen, dass in der Wasserphase eine Gesamtzellzahl von ca.  $10^4$  bis  $10^5$  Zellen/ml im Trinkwasser gefunden werden konnte. Die Koloniezahl nach Trinkwasserverordnung (TrinkwV 1990) lag meist im ein- oder zweistelligen Bereich. In nur einer von 18 Trinkwasserproben wurden coliforme Bakterien



nachgewiesen. *E. coli* oder *P. aeruginosa* konnten nicht festgestellt werden. In dieser Studie wurden auch Rohre aus dem Verteilungsnetz beprobt. Hier zeigte sich, dass bei allen Proben eine mikrobielle Besiedlung (Biofilme) gefunden werden konnte. Die Gesamtzellzahl der Biofilme lag zwischen  $10^4$  und  $10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup> und die Koloniezahl auf R2A (HPC-Methode siehe 3.3.2.1.) im Bereich von  $10^1$  bis  $10^5$  KBE/cm<sup>2</sup>. Es konnten maximal 3,4 % aller Zellen kultiviert werden. Die Koloniezahl nach TrinkwV lagen zwischen 0 und  $10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup>. In 2 von 18 Biofilmp Proben wurden coliforme Bakterien nachgewiesen. *E. coli* oder *P. aeruginosa* konnten nicht festgestellt werden. Des Weiteren wurden in dieser Studie auch verschiedene Werkstoffe (Kupfer, Stahl, PE und PVC) auf Biofilmbildung untersucht. Nach 18 Monaten im Trinkwasser waren kaum Unterschiede erkennbar. Die flächenbezogenen Zellzahlen lagen im Bereich von  $10^6$  bis  $10^7$  Zellen/cm<sup>2</sup>, die Koloniezahl auf R2A im Bereich  $10^4$  bis  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup>. Üblicherweise waren hier 1 % – 0,1 % der Bakterien kultivierbar. In diesen Biofilmen waren zwar coliforme Bakterien auf PVC und in einem Fall *P. aeruginosa* auf PE nachweisbar, aber *E. coli* oder Legionellen konnten nicht nachgewiesen werden. In einer Untersuchung in Finnland und Lettland wurden auf PVC ähnliche Gesamtzellzahl- und HPC-Werte gefunden (Lehtola et al. 2004).

Innerhalb der oben erwähnten Studie wurden Biofilme molekularbiologisch charakterisiert (Szewzyk et al. 2003). Von 10 Probenahmen wurden 86 Isolate aerob kultiviert und vorläufig sequenziert. Hieraus ergab sich, dass 53 % der Isolate Gram-positiven und 47 % Gram-negativen Eubakterien zuzuordnen waren. Die Verteilung der Isolate setzte sich aus 30 % Gram-positiver Bakterien mit G-C-reicher, 23 % Gram-positiver Bakterien mit G-C-ärmer DNA, sowie 19 % alpha-, 3 % beta-, 19 % gamma- und 6 % delta-Proteobakterien zusammen. Ein hoher Anteil an alpha- und gamma-Proteobakterien scheint für ältere Trinkwasserbiofilme typisch zu sein (z. B.: Schmeisser et al. 2003). Junge Biofilme zeigen eher einen höheren Anteil an beta-Proteobakterien auf (z. B.: Kalmbach et al. 1997).

Werkstoffe im Wasserverteilungssystem können Einfluss auf Biofilme haben. Es gibt eine Vielzahl an Untersuchungen über Werkstoffe im Trinkwasser (Übersicht in Wingender et al. 2003). Unterschiede der Werkstoffe relativieren sich aber meistens mit zunehmendem Alter des Bewuchses. Auf Zement sind Koloniezahlen von  $10^1$  bis  $10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> und auf Gusseisen von  $10^2$  bis  $10^7$  gefunden worden (Übersicht in Wingender et al. 2003). Materialien, die Nährstoffe abgeben können, weisen eine deutlich höhere Besiedlung auf. Untersuchungen an gummibeschichteten Absperrschiebern in Trinkwasserverteilungssystemen zeigten, dass dort Biofilme mit Gesamtzellzahlen im Bereich von  $10^6$  bis  $10^9$  Zellen/cm<sup>2</sup> und HPC-Werten von  $10^5$  bis  $10^9$  KBE/cm<sup>2</sup> gefunden werden konnten (Kilb et al. 2003). Hier lag der Anteil der kultivierbaren Bakterien bei 2 % bis fast 100 %. In 15 von 21 Biofilmp Proben konnten hier coliforme Bakterien, in einer Probe *P. aeruginosa* nachgewiesen werden.

In der zuvor erwähnten BMBF-Studie (Flemming 2003) wurden kaum hygienisch relevante Mikroorganismen in Biofilmen des Trinkwasserverteilungsnetzes gefunden. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch eine Studie von LeChevallier et al. (1987). Allerdings gibt es immer wieder Veröffentlichungen über Einzelbefunde von hygienisch relevanten Mikroorganismen in Biofilmen aus Trinkwasserverteilungssystemen (z. B.: Szewzyk et al. 2000, Percival et al. 2000).

Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass hygienisch relevante Organismen durchaus in Biofilmen in Trinkwasserverteilungssystemen nachweisbar waren. Beispielsweise in Biofilmen auf Rohrleitungen aus verschiedenen Ländern (England, Litauen, Frankreich und Portugal) konnte *E. coli* mit der FISH-Technik (siehe 1.5.2) nachgewiesen werden (Juhna et al. 2007). Watson et al. (2004) konnten in England *Helicobacter pylori* in Trinkwasser und Biofilmen anhand von PCR-Untersuchungen (PCR = Polymerase Ketten Reaktion) nachweisen. Dabei waren in 151 Proben über Kultivierungsmethoden auf Agar-Medien kein Nachweis von *H. pylori* möglich, aber in 26 % der Proben wurde *H. pylori* durch die PCR nachgewiesen. Auch Park et al. (2001) konnten in einem Biofilm aus einem schottischen Trinkwasserverteilungssystem DNA von *Helicobacter* mittels PCR nachweisen. Eine Studie in Schottland zeigte, dass von 47 untersuchten Rohrleitungen alle mit Biofilm belegt waren. 15 % der Biofilme enthielten coliforme Bakterien. Von 38 Proben waren in 30 Mykobakterien nachweisbar. *H. pylori* konnte in 5 von 38 Proben nachgewiesen werden (ESW Scientific 2002). In Süd-Afrika wurden bei einer Untersuchung *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* und *Enterobacter* in Trinkwasserbiofilmen gefunden, allerdings keine Salmonellen oder Shigellen. Die nachgewiesenen Pseudomonaden konnte *P. aeruginosa* nicht zugeordnet werden (September et al. 2007). Das auch Mykobakterien in Trinkwassersystemen nachgewiesen werden konnten stellten Vaerewijck et al. (2005) dar. Pryor et al. (2004) konnten bei Untersuchungen eines Trinkwasserverteilungssystems zwar Legionellen nachweisen, allerdings wurde *Legionella pneumophila* nicht gefunden. Des Weiteren konnten Mykobakterien, darunter auch *Mycobacterium avium* und *M. intracellulare*, nachgewiesen werden.

*P. aeruginosa* wurde bisher kaum in Biofilmen in Trinkwasserverteilungssystem nachgewiesen. Zum Beispiel Kilb et al. (2003) berichteten von einem Befund und Wingender et al. (2003) konnten auch in einer Biofilmprobe *P. aeruginosa* nachweisen.

Um das Kontaminationspotential von Biofilmen in Trinkwasserverteilungssystemen zu betrachten werden häufig Laborexperimente eingesetzt. Hierbei werden Biofilme mit Trinkwasser auf Oberflächen angezüchtet und dann mit dem zu untersuchenden Mikroorganismus beimpft.

Zum Beispiel konnten Lehtola et al. (2007) in Laborexperimenten zeigen, dass in Trinkwasserbiofilmen *M. avium* über ein 4-Wochen-Experiment und *L. pneumophila* über ein 2-Wochen-Experiment anhand der FISH-Technik und kulturell nachweisbar waren. *E. coli* war nach 9 Tagen nicht mehr nachweisbar während Caliciviren über

ein 3-Wochen-Experiment anhand der PCR nachweisbar waren. In Laborexperimenten mit Trinkwasserbiofilmen konnten Bomo et al. (2004) Aeromonaden über 30 Tage anhand der FISH-Technik und kulturell nachweisen. *C. jejuni* konnte über 7 Tage anhand der FISH-Technik aber nur 1 Tag kulturell in Laborexperimenten mit Trinkwasserbiofilmen nachgewiesen werden (Lehtola 2006). Långmark et al. (2005a) untersuchten das Verhalten von *L. pneumophila* in einer Versuchsanlage eines Trinkwasserverteilungssystems. Dabei konnte *L. pneumophila* über die Versuchsdauer (38 Tage) in den Biofilmen mit der FISH-Technik nachgewiesen werden. Anhand von Untersuchungen mit *H. pylori* konnten Gião et al. (2008) zeigen, dass dieser 31 Tage in Trinkwasserbiofilmen in nahezu unveränderter Konzentration nachweisbar war. Torvinen et al (2007) konnten *M. avium* über einen Versuchszeitraum von 4 Wochen in nahezu unveränderter Konzentration in Trinkwasserbiofilmen nachweisen. Untersuchungen von Fass et al. (1996) in einer Versuchsanlage eines Trinkwasserverteilungssystems konnten nachweisen, dass sich *E. coli* in Biofilme einnistete und über Kultivierungsmethoden über den Versuchszeitraum (18 Tage) nachweisen ließen. In Experimenten von Williams und Braun-Howland (2003) mit *E. coli* in einem Model-Trinkwasserverteilungssystem, konnte dieser über 10 Tage in den Biofilmen anhand der FISH-Technik nachgewiesen werden. Hierbei wurde in den Trinkwasserbiofilmen auch *L. pneumophila* über die FISH-Technik und Antikörper nachgewiesen. Juhna et al. (2007) wies *E. coli* durch die FISH-Technik über einen Zeitraum von 10 Tagen, in nahezu unveränderten Konzentrationen, in Trinkwasserbiofilmen nach, während dieser über Kultivierungsmethoden kaum oder gar nicht nachweisbar war. In Experimenten mit coliformen Bakterien konnten Camper et al (1996) diese 8 Wochen lang in Trinkwasserbiofilmen nachweisen. Untersuchungen von Helmi et al. (2008) zeigten, dass die Protozoen *C. parvum* und *G. lamblia* nach 35 Tagen in Trinkwasserbiofilmen noch nachgewiesen werden konnten. Polioviren waren anhand von PCR-Untersuchungen über den Untersuchungszeitraum von 35 Tagen nachweisbar, während infektiöse Polioviren nur 6 Tage lang nachweisbar waren.

Die Bewertung, ob Biofilme in Trinkwasserverteilungssystemen ein nutzbares Habitat für hygienisch relevante Mikroorganismen darstellt, ist nicht leicht zu beantworten. Wie oben beschrieben, gibt es recht unterschiedliche Befunde. In Trinkwasserverteilungssystemen wurden nur sporadisch hygienisch relevante Mikroorganismen nachgewiesen. Allerdings zeigte sich in Laborexperimenten, dass es möglich war, hygienisch relevante Mikroorganismen in Biofilmen aus Trinkwasserbakterien einzunisten. Inwieweit sich solche Mikroorganismen aber nachweisen lassen, ist immer methodenabhängig. Zum Beispiel kann anhand der PCR das Vorhandensein von spezifischer DNA nachgewiesen werden. Dies ist aber noch kein Beweis für das Vorhandensein der entsprechenden vermehrungsfähigen oder infektiösen Organismen. Über Kultivierungsmethoden werden vermehrungsfähige Mikroorganismen nachgewiesen. Hierbei kann es aber zu einer Unterbewertung der eigentlichen Präsenz führen, da kaum alle aktiven Zellen eines

Zielorganismus auf einem Medium ohne Störung durch andere Organismen erfasst werden können. Durch die Verwendung von Selektivmedien kann die Begleitflora zwar unterdrückt werden, dies bedeutet aber auch Stress für den Zielorganismus, was zu einer verringerten Nachweisbarkeit führen kann. Die FISH-Methode hat als Ziel häufig rRNA-Sequenzen. Hiermit können sehr spezifisch die Mikroorganismen nachgewiesen werden, allerdings ist die Quantifizierung aufgrund des Verhältnisses Gesamtzellen zu FISH-positiven Zellen oft schwierig. Auch gibt es Unterschiede zwischen Laborexperimenten und dem Trinkwasserverteilungssystem. In den Laborexperimenten handelt es sich häufig um relativ junge Biofilme (Anzucht über Wochen). Es gibt aber Hinweise, dass es Veränderungen in alternden Biofilmen gibt (siehe oben). Ob diese Unterschiede sich auf die Einnistung und/oder Persistenz von hygienisch relevanten Mikroorganismen auswirken, ist unbekannt. Dennoch haben Untersuchungen in Trinkwassersystemen schon zum Nachweis von hygienisch relevanten Mikroorganismen geführt. Es scheint also für bestimmte pathogene Mikroorganismen möglich zu sein, sich unter gegebenen Umständen in Biofilme im Trinkwasserverteilungssystem einzunisten und zu halten. Ob und inwieweit Einflüsse von EPS-Komponenten, sei es im Biofilm oder an hygienisch relevanten Mikroorganismen, dabei eine Rolle spielen, ist ungeklärt. Es ist aber bekannt, dass EPS-Komponenten bei der Biofilmbildung von Bedeutung sind (siehe 1.4.1.1.1, Beispiel *P. aeruginosa*). Ein Effekt von EPS-Komponenten bei der Einnistung und/oder Persistenz ist also nicht auszuschließen.

## 1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von EPS auf die Einnistung und/oder Persistenz von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme zu untersuchen. Hierbei sollten sowohl die EPS von *P. aeruginosa* als auch die EPS der Trinkwasserbiofilme berücksichtigt werden. Dazu wurden folgende Teilaspekte bearbeitet:

- Evaluierung von Methoden zur EPS-Isolierung
- Miniaturisierung der EPS-Isolierung (Ziel: Probenvolumen ca. 10 ml)
- Charakterisierung von EPS
- Untersuchung der Einnistung und Persistenz von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme
- Lokalisierung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilmen

## 2 Material

### 2.1 Mikroorganismen

#### *P. aeruginosa* SG81

Dieses mucoide (Alginat produzierende) Umweltisolat wurde ursprünglich aus einer Hausinstallation (Abfluss) eines fleischverarbeitenden Betriebes in Duisburg isoliert (Grobe et al. 1995).

#### *P. aeruginosa* SG81 R1

Dieser Stamm ist eine nicht-mucoide Spontanmutante von *P. aeruginosa* SG81 (Grobe 1996)

#### *P. aeruginosa* DSM 50071

Dieser nicht-mucoide Typ-Stamm ist bei der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig (DSMZ) erhältlich.

#### *P. aeruginosa* FRD1

Bei diesem mucoiden (Alginat produzierende) Stamm handelt es sich um ein klinisches Isolat eines Patienten mit cystischer Fibrose (Ohman und Chakrabarty 1981).

#### *P. aeruginosa* PA14

Hierbei handelt es sich um ein häufig in der Biofilmforschung verwendetes klinisches Human-Isolat (bekannt als UCBPP-PA14 nach Rahme et al. 1995 später bekannt als PA14 siehe Plotnikova et al. 2000).

#### *P. aeruginosa* PAO1

Der nicht-mucoider Wildtyp und die Mutanten PATI2 ( $\Delta$ LecB) und PATI5 ( $\Delta$ LecA  $\Delta$ LecB) wurden von K.-E. Jäger, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen (Tielker 2005).

## 2.2 Gen-Sonden

Tabelle 7: Gensonden und ihre Spezifität

Sonde (Fluorochrom)	Sequenz	Ziel	Spezifität
EUB338 (Cy3)	5'- GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	16S rRNA, 338	Bakterien (Manz et al. 1995)
NONEUB338 (Cy3)	5'-CGACGGAGGGGCATCCTCA-3'		Negativkontrolle (Kempf et al. 2000)
Psae 16S-182 (Cy3)	5'-CCACTTTCTCCCTCAGGACG-3'	16S rRNA, 182	<i>P. aeruginosa</i> (Wellinghausen et al. 2005)
Psae (Cy3)	5'- TCTCGGCCTTGAAACCCC-3'	23S rRNA, 1506	<i>P. aeruginosa</i> (Kempf et al. 2000)

## 2.3 Nährmedien

Caseinpepton-Sojamehlpepton–Bouillon 1/100 konzentriert (CASO–Bouillon)

(Fa. Merck, Art.-Nr. 1.05459)

pH = 7,3 ± 0,2 bei 25 °C	Zusammensetzung	(mg/l)
	Caseinpepton	170
	Sojamehlpepton	30
	D(+)-Glucose	25
	Natriumchlorid	50
	<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat	25

Nähr-Agar (Fa. Difco, Art.-Nr. 213000)

pH 6,8 ± 0,2 bei 25 °C	Zusammensetzung	(g/l)
	Fleischextrakt	3,0
	Pepton	5,0
	Agar	15,0

Pseudomonas Agar-Basis (Fa. Oxoid, Art.-Nr. CM0559)

pH = 7,1 ± 0,2 bei 25 °C	Zusammensetzung	(g/l)
	Gelatinepepton	16,0
	Caseinhydrolysat	10,0
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10,0
	MgCl <sub>2</sub>	1,4
	Agar	11,0

24,2 g des Granulates wurden 5 ml Glycerin zugesetzt und in 500 ml deionisiertem Wasser suspendiert

CN-Supplement (Fa. Oxoid, Art.-Nr. SR0102E)

Zusammensetzung	pro Fläschchen
Cetrimid	100 mg
Nalidixinsäure	7,5 mg

Der Inhalt eines Fläschchens wurde in einer Mischung aus 1 ml sterilem, deionisiertem Wasser und 1 ml Ethanol gelöst.

CN-Agar

500 ml der autoklavierten Pseudomonas Agar-Basis wurde bei 50 °C der Inhalt eines Fläschchens CN-Supplement zugesetzt.

Pseudomonas-Isolierungs-Agar (PIA) (Fa. Difco, Art.-Nr. 292710)

pH 7,0 ± 0,2 bei 25 °C	Zusammensetzung	(g/l)
	Pepton	20,0
	MgCl <sub>2</sub>	1,4
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10,0
	Irgasan	0,025
	Agar	13,6

45 g des Granulates wurden 20 ml Glycerin zugesetzt und in 980 ml deionisiertem Wasser suspendiert.

Für die Herstellung von 0,1 M Ca-PIA wurden dem PIA nach dem Autoklavieren bei ca. 60 °C 10 ml einer Lösung zugegeben, die 14,7 g CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O enthielt. Diese Lösung wurde zuvor sterilfiltriert (0,2µm).

R2A-Medium (Fa. Difco, Art.-Nr. 218263)

pH 7,2 ± 0,2 bei 25 °C	Zusammensetzung	(g/l)
	Hefeextrakt	0,5
	Proteasepepton No.3	0,5
	Casaminosäuren	0,5
	D-(+)-Glucose	0,5
	Lösliche Stärke	0,5
	Natriumpyruvat	0,3
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,05
	Agar	15,0

Die Nährmedien wurden in Form käuflicher Fertiggranulate eingesetzt. Als Lösemittel wurde deionisiertes Wasser verwendet. Die gelösten Nährmedien wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die Agar-Medien wurden zu 25 ml Portionen in Petrischalen gegossen und nach dem Erkalten bei 4 °C gelagert.

## 2.4 Chemikalien

Calciumchlorid, p. A. (Fa. Fluka, Art. Nr. 21101) $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ M = 147,02 g/mol
Desoxyribonucleinsäure (DNA) aus Kalbsthymus (Fa. Merck, Art.-Nr. 1.24013)
Dowex 50 x 8 ( $\text{Na}^+$ -Form, Fa. Fluka, Art.-Nr. 44445, jetzt Dowex™ Marathon™ C, Fa. Sigma-Aldrich Art.-Nr. 91973)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Fa. Roth, Art.-Nr. 8040.3) $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ M = 292,25 g/mol
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA mit 4 Na), ≥99 % (Fa. Sigma, Art.-Nr. ED4SS ) $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{Na}_4\text{O}_8$ M = 416,20 g/mol
Ethanol, p. A. (Fa. Roth, Art.-Nr. 9065.4) $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ M = 46,07 g/mol
Folin & Ciocalteu's Phenolreagenz 2 N (Fa. Sigma, Art.-Nr. F-9252)
Formaldehyd-Lösung 37 %ig, p. A. (Fa. J. T. Baker, Art.-Nr. 7040)
Formamid, ≥99,5 % (Fa. Roth, Art.-Nr. P040.1) $\text{CH}_3\text{NO}$ M = 45,05 g/mol
D(+)-Glucose, 99,5 % (Fa. Sigma, Art.-Nr. G-7528) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ M = 180,16 g/mol
D-Glucose-6-phosphat, 99 % (Fa. Sigma, Art.-Nr. G-7879) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NaO}_9\text{P}$ M = 282,12 g/mol
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ) (Fa. Sigma, Art.-Nr. G-8529)
Glucuronsäure (Fa. Sigma , Art.-Nr. G-5269) $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$ M = 194,1 g/mol
Glycerin wasserfrei, p. A. (Fa. Fluka, Art.-Nr.) $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ M = 92,1 g/mol
m-Hydroxybiphenyl, 90 % (Fa. Sigma, Art.-Nr. H-6527) $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}$ M = 170,2 g/mol
Huminsäure (Fa. Fluka, Art.-Nr. 53680)
Kaliumchlorid (Fa. J.T. Baker, Art.-Nr. 0509 ) $\text{KCl}$ M = 74,56 g/mol
Kalium-di-hydrogenphosphat (Fa. Merck, Art.-Nr. 4873) $\text{KH}_2\text{PO}_4$ M = 136,09 g/mol
Kaliumhydroxid (Fa. J.T. Baker, Art.-Nr. 0385) $\text{KOH}$ M = 56,11 g/mol
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat, p. A. (Fa. Merck, Art.-Nr. 2790) $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ M = 249,68 g/mol
Magnesiumchlorid, p. A (Fa. Merck, Art.-Nr. 1.05833) $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ M = 203,30 g/mol
Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat ( $\beta$ -NADP) (Fa. Sigma, Art.-Nr. N.-0505) $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3\text{Na}$ M = 765,4 g/mol



Natriumcarbonat, p. A. (Fa. Merck, Art.-Nr. 6392)	
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	M = 105,99 g/mol
Natriumchlorid, p. A. (Fa. Riedel-de Haën, Art.-Nr. 31434)	
$\text{NaCl}$	M = 58,44 g/mol
Natrium-Dodecylsulfat (SDS), 99 % (Fa. Merck, Art.-Nr. 113760)	
$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$	M = 288,4 g/mol
Natrium-di-hydrogenphosphat-Monohydrat, p. A. (Fa. Merck, Art.-Nr. 1.06346)	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	M = 137,99 g/mol
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, p. A. (Fa. Riedel-de Haën, Art.-Nr. 30412)	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	M = 177,99 g/mol
Natriumhydroxid, p. A. (Fa. KMF, Art.-Nr. 08-620)	
$\text{NaOH}$	M = 40 g/mol
Natriumphosphat, p. A. (Fa. Merck, Art.-Nr. 1.06578)	
$\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$	M = 380,12 g/mol
Natriumtartrat, p. A. (Fa. Merck, Art.-Nr. 1.06663)	
$\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	M = 230,08 g/mol
Natriumtetraborat-Decahydrat, p. A. (Fa. Fluka, Art.-Nr. 72000)	
$\text{B}_4\text{Na}_2\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$	M = 381,37 g/mol
Paraformaldehyd, p. A. (Fa. Merck, Art.-Nr. 1.04005)	
$(\text{CH}_2\text{O})_n$	
Phenol, p. A. (Fa. Riedel-de Haën, Art.-Nr. 33517)	
$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$	M = 94,11 g/mol
Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA), 96 % (Fa. Sigma, Art.-Nr. A 4503)	
Salzsäure 25 % p. A. (Fa. J. T. Baker, Art.-Nr. 6167)	
$\text{HCl}$	M = 36,46 g/mol
Schwefelsäure 95 % – 97 % p. A. (Fa. KMF, Art.-Nr. 08-743)	
$\text{H}_2\text{SO}_4$	M = 98,08 g/mol
Sulfaminsäure, p. A. (Fa. Sigma-Aldrich, Art.-Nr. 24,272-2)	
$\text{NH}_3\text{SO}_3$	M = 97,09 g/mol
Tris(hydroxymethyl)aminoethan (TRIS) 99,9 % (Fa. Roth, Art.-Nr. 4855.1)	
$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	M = 121,14 g/mol
Wasserstoffperoxid-Lösung 30 %ig, p. A. (Fa. Merck, Art.-Nr. 1.07209)	
$\text{H}_2\text{O}_2$	M = 34,02
Wasser (Rotipuran) (Fa. Roth, Art.-Nr. T172.1)	
Wasser (für die Molekularbiologie) (Fa. Roth, Art.-Nr. T143.1)	
Wasser (Ultrapur) (Fa. Merck, Art.-Nr. 1.01262)	

## 2.5 Kits, Puffer und Lösungen

NanoOrange® Protein Quantitation Kit (Fa. Molecular Probes, Art.-Nr. N6666)

LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit (SYTO 9 und Propidiumiodid) (Fa. Molecular Probes, Art.-Nr. L7012)

Chlor-Mess-Kit Chematest 20 Swan (Fa. Swan)

Mit den Lösungen Oxycon Start und Oxycon DPD

### Kupferlösung 1

0,0408 g  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$  wurden in 100 ml deionisiertem Wasser ( $1,63 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ ) gelöst.

Diese Lösung wurde 1:1000 verdünnt ( $1,63 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ ), dies entsprach einer Kupferkonzentration ( $\text{Cu: M} = 63,55 \text{ g/mol}$ ) von  $1,04 \times 10^{-4} \text{ g/l}$  oder  $104 \text{ µg/l}$ .

### Kupferlösung 2

0,0392 g  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$  wurden in 100 ml deionisiertem Wasser ( $1,57 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ ) gelöst.

Diese Lösung wurde 1:1000 verdünnt ( $1,57 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ ), dies entsprach einer Kupferkonzentration ( $\text{Cu: M} = 63,55 \text{ g/mol}$ ) von  $9,98 \times 10^{-5} \text{ g/l}$  oder  $99,8 \text{ µg/l}$ .

### Phosphatpuffer (pH 7,0) für die EPS-Isolierung

Zusammensetzung	(g/l)
2 mmol/l $\text{Na}_3\text{PO}_4$	0,760
4 mmol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0,552
9 mmol/l NaCl	0,526
1 mmol/l KCl	0,075

Alle Komponenten wurden in deionisiertem Wasser gelöst und auf pH 7 mit 0,1 M HCl einstellen

### NaOH 1 M für die EPS-Isolierung

40 g/l NaOH wurden in deionisiertem Wasser gelöst.

### NaOH 0,5 %ig für die Bestimmung von Uronsäuren

50 g/l NaOH wurden in deionisiertem Wasser gelöst.

Tris/HCl-EDTA-Puffer für die DNA-Bestimmung mit DAPI

Zusammensetzung	(g/l)
100 mM NaCl	5,844
10 mM EDTA	2,923
10 mM TRIS	1,211

1,169 g NaCl, 0,585 g EDTA und 0,242 g Tris wurden in etwa 180 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit verdünnter HCl oder NaOH der pH-Wert auf 7,0 einstellen. Mit deionisiertem Wasser wurde anschließend auf 200 ml aufgefüllt und der Puffer im Kühlschrank lagern.

120 mM Tris/HCl-Puffer für die Bestimmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenaseaktivität

1,45 g Tris wurden in ca. 80 ml deionisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit HCl auf 8,6 einstellen. Mit deionisiertem Wasser wurde anschließend auf 100 ml aufgefüllt und der Puffer im Kühlschrank gelagert.

**Lösungen/Puffer für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH):**PBS pH 7,2 (phosphate buffered saline)

Zusammensetzung	(g/l)
NaCl	8,00
KCl	0,20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,81
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24

Die Komponenten wurden in 900 ml Rotipuran-Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 0,1 mol/l HCl bzw. NaOH eingestellt und dann auf 1 l mit Rotipuran-Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde der Puffer autoklaviert.

4 % Paraformaldehyd in PBS

4 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS lösen und anschließend sterilfiltrieren.

0,25 M EDTA-Lösung

10,41 g EDTA (mit 4 Na) wurden in 100 ml Rotipuran-Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.

5 M NaCl-Lösung

29,22 g NaCl wurden in 100 ml Rotipuran-Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.

10 %ige SDS-Lösung

10 g SDS in 100 ml Rotipuran-Wasser lösen und anschließend sterilfiltrieren.

1 M TRIS-Puffer pH 8

121,14 g TRIS in 900 ml Rotipuran-Wasser lösen und den pH-Wert mit HCl (25 %ig) auf pH 8 einstellen. Anschließend wurde mit Rotipuran-Wasser auf 1 l aufgefüllt und der Puffer autoklaviert.

Hybridisierungspuffer 40 % (für alle Sonden)

40 % Rotipuran-Wasser

18 % 5 M NaCl-Lösung

2 % 1 M TRIS-Puffer pH 8

0,1 % 10%ige SDS-Lösung

40 % Formamid

Waschpuffer 40 %

1 ml 1 M TRIS-Puffer pH 8, 560 µl 5 M NaCl-Lösung, 1 ml 0,25 M EDTA-Lösung und 50 µl 10 %ige SDS-Lösung wurden mit Rotipuran-Wasser auf 50 ml aufgefüllt und gemischt.

Sonden-Lösung

Die Sonden-Lyophilisate wurden zu je 1 µg/µl in Wasser für die Molekularbiologie gelöst. Als Stammlösungen wurden je 10 µl dieser Lösung mit 190 µl Wasser für die Molekularbiologie verdünnt (50 ng/µl). Für die FISH wurde 1 µl der Stammlösung (50 ng/µl) mit 9 µl Hybridisierungspuffer verdünnt (Endkonzentration 5 ng/µl).

**Färbelösungen mit DAPI:**Bestimmung der Gesamtzellzahl

5 mg DAPI in 200 ml sterilfiltriertem deionisiertem Wasser mit 2 % Formaldehyd lösen (25 µg/ml).

Gesamtzell-Färbung bei der FISH

10 µl DAPI-Stammlösung (25 µg/ml) in 240 µl sterilfiltriertem PBS-Puffer verdünnen.

## **2.6 Fluoreszenzfarbstoffe und fluoreszenzmarkierte Lektine**

4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) (Fa. Sigma, Art.-Nr. D 9542)

$C_{16}H_{15}N_5 \times 2 HCl$  M = 350,2 g/mol

SYTO 9 (Fa. Invitrogen, aus dem LIVE/DEAD-Kit)

3,34 mM in DMSO

SYTO 62 (Fa. Invitrogen, Art.-Nr. 511344)

5 mM in DMSO

Concanavalin A, fluoreszenzmarkiert mit Fluorescein Isothiocyanat (ConA-FITC)  
(Fa. Sigma, Art.-Nr. C 7642)

LecB fluoreszenzmarkiert mit Yellow Fluorecent Protein (LecB-YFP) (zur Verfügung gestellt von D. Tielker, hergestellt nach Tielker et al. 2005)

Wheat germ, fluoreszenzmarkiert mit Fluorescein Isothiocyanat (WGA-FITC)  
(Fa. Sigma, Art.-Nr. L-4895)

## 2.7 Geräte

### 2.7.1 Mikroskope

#### Fluoreszenz-Mikroskop

Typ Laborlux S (Fa. Leitz)

- Objektive: PL Fluotar 10x / 0.30; 25x / 0.60; 40x / 0.70; 100x / 1.32 Öl
- Okular: 2x Periplan 10x / 18
- UV-Einheit HBO 50

#### Konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM)

- Konfokales Laser Scanning Modul LSM 510 der Firma Carl Zeiss Jena gekoppelt an ein inverses Mikroskop Typ Axiovert 100 M BP (Fa. Zeiss)
- Argon-Ionen-UV-Laser 351 nm, 364 nm (80 mW)
- Argon-Laser: 458 nm, 488 nm, 514 nm (25 mW)
- Helium-Neon-Laser: 543 nm (1 mW), 633 nm (5 mW)
- Objektive: Plan – Neofluar 10x / 0.30  
Plan – Neofluar 20x / 0.50  
LD Achroplan 40x / 0.60 Korr.  
LD Achroplan 63x / 0,75 Korr.  
Plan – Neofluar 100x / 1.30 Öl
- Okular: E-PI 10x / 20
- Zeiss LSM 510 Software Release 3.2 Sp2
- Steuerungsrechner: Pro M7 (Fa. Siemens Scenic)
- UV-Einheit HBO 50/AC

#### Stereo-Mikroskop

Typ Leica MZ 6 (Fa. Leica)

- Objektive: verstellbar von 0,63x bis 4.0x
- Okular: 10x / 21B

### 2.7.2 Photometer

Cary 50 Bio UV-Visible Spectrometer	(Fa. Varian)
UV-1202 UV-VIS Spectrophotometer	(Fa. Shimadzu)
Cell density meter model 40	(Fa. Fisher Scientific)
Chlor-Photometer-Kit	(Fa. Swan)

### 2.7.3 Fluorimeter

SFM 25 (Fa. Kontron Instruments)

### 2.7.4 Laborgeräte

Brutschrank 36 °C	Kelvitron t (Fa. Heraeus)
Brutschrank 20 °C	GTR 214 (Fa. Memmert)
Magnetrührer- / Heizplatte	RCT basic (Fa. IKA Labortechnik)
Vortex	Genie 2 (Fa. Scientific Industries)
Stomacher	Stomacher 400 Circulator (Seaward)
Rührwerk	RW 20 DZM.n (Fa. IKA Labortechnik)
Trockenschrank	T6060 (Fa. Heraeus)
Muffelofen	K114 (Fa. Heraeus)
Wasserbad	GFL 1013 (Fa. Gesellschaft für Labor-Technik mbH)
Zentrifugen	Kühlzentrifuge RC 26 Plus (Fa. Sorvall) mit Rotor SS-34
	Biofuge fresco (Fa. Heraeus)
pH-Meter	pH540 GLP Multical (Fa. WTW)
Temperaturmessgerät	ama-digit ad 30th
Hybridisierungsöfen	Hybaid Shake´n´Stack (Fa. Thermo)

## 2.8 Software

Zeiss

LSM Image Browser Version 4.0.0.157

AxioVision Version 3.1

## 2.9 Sonstiges

Einmalküvetten Makro (PMMA) (über Fa. VWR, Art.-Nr. 634-8530 Q)

Cryobank (Fa. Mast Diagnostica GmbH)

Filter  
Membrane Filters 0,2 µm GTBP  
(Fa. Millipore, Art.-Nr. GTBP02500)  
Membrane Filters 0,2 µm GTTP  
(Fa. Millipore, Art.-Nr. GTtP02500)

Vakuumfiltrationseinheit ZapCap® (über Fa. VWR, Art.-Nr. ZapCap S0,2CA)

Absorbant Pads (Fa. Millipore, Art.-Nr. AP1002500)

Objektträger 8 Wells, 6 mm (über Fa. Roth, Art.-Nr. L197.1)

Einbettmedium AF2 Citifluor Mountant Solution (Fa. Citifluor Ltd)

Imersionsöl (Fa. Leica)

Sterilfilter Filtropur S plus 0,2  
(Fa. Sarstedt, Art.-Nr. 83.1826.102)

Dialyseschlauch Visking dialysis tubing 20/32  
(Fa. Serva, Art.-Nr. 44110)

Stomacherbeutel Blander Bags Seperator 400 (Fa. Grade)

Falcontubes 50 ml (Fa. Sarstedt)

## **3 Methoden**

### **3.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden**

#### **3.1.1 Stammhaltung**

Für die EPS-Isolierung wurde *P. aeruginosa* SG81 auf PIA kultiviert, im Kühlschrank bei 4 °C gelagert und alle 6 Wochen auf neues Nährmedium überführt.

Für die Einnistungsexperimente wurden die Teststämme als Gefrierkulturen in Kryoröhrchen (Cryobank) bei -70 °C gelagert und einmal im Jahr überführt.

#### **3.1.2 Anzucht der Bakterien für die EPS-Isolierung**

Aus der Stammhaltungskultur von *P. aeruginosa* SG81 wurde eine Vorkultur auf PIA angelegt und über Nacht bei 36 °C kultiviert. Aus dieser Vorkultur wurde eine Suspension in deionisiertem Wasser (Zelldichte nach McFarland Standard 0,5 entspricht ca.  $10^8$  Zellen/ml) hergestellt, 100 µl dieser Suspension auf PIA ausplattiert und 1 Tag bei 36 °C auf PIA bebrütet.

#### **3.1.3 Anzucht der Bakterien für die Einnistungsexperimente**

Für die Versuche wurden die Gefrierkulturen der Teststämme auf nährstoffreichem Nährmedium (Nähragar, PIA) vorkultiviert (24 h, 36 °C). Von diesen Vorkulturen wurden Einzelkolonieausstriche auf nährstoffreichem Nährmedium (Nähragar, PIA) angefertigt und 24 Stunden bei 36 °C bebrütet, um die Koloniemorphologie zu überprüfen. Diese Vorkulturen wurden dann auf R2A überführt, 3 Tage bei 20 °C bebrütet, auf frischen R2A überführt und für weitere 3 Tage bei 20 °C bebrütet.



## 3.2 EPS-Isolierung

Um die Ausbeute an EPS auf einen Parameter beziehen zu können wird üblicherweise die Trockenmasse (TM) oder der Glühverlust (GV) verwendet.

### 3.2.1 Trockenmasse und Glühverlust

#### **Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehaltes nach DIN EN 12880**

Begriffserläuterung:

Trockenrückstand: Der nach dem festgelegten Trocknungsverfahren erhaltene Massenanteil an fester Substanz in einem Schlamm.

Wassergehalt: Massenanteil des Wassers im Schlamm. Er wird unter definierten Bedingungen nach dem festgelegten Trocknungsverfahren bestimmt.

Trockenmasse: Die nach dem festgelegten Trocknungsverfahren erhaltene Masse an fester Substanz.

Massenkonstanz: Sie ist erreicht, wenn während des Trocknungsvorgangs die Massendifferenz zwischen 2 aufeinander folgenden Wägungen der zuerst erwärmten und dann auf Raumtemperatur abgekühlten Probe, die im Abstand von einer Stunde durchgeführt werden, nicht mehr als 0,5 % (m/m) der letztbestimmten Masse oder 2 mg ist, wobei die größere Abweichung zulässig ist.

Die Bestimmung wurde durchgeführt, indem ein leerer Tiegel im Wärmeschrank für mindestens 30 min auf 105 °C erwärmt wurde. Nach Abkühlen im Exsikkator auf Raumtemperatur (ca. 5 min) wurde der Tiegel auf 1 mg genau gewogen.

Wurde derselbe Tiegel für die anschließende Bestimmung des Glühverlustes verwendet, musste er mindestens 30 min auf 550 °C erhitzt werden.

Der Tiegel wurde mit der Probe gewogen und anschließend so lange auf 105 °C erhitzt, mindestens über Nacht, bis der Rückstand trocken erschien.

Nach Abkühlen im Exsikkator auf Raumtemperatur (ca. 5 min) wurde zum ersten Mal der Rückstand gewogen.

Die Probe wurde solange erhitzt und gewogen, bis die Massenkonstanz erreicht war.

Berechnung des Trockenrückstandes:

$$\text{Trockenrückstand} = \frac{T_{\text{getrocknet}} - T_{\text{leer}}}{T_{\text{Probe}} - T_{\text{leer}}} \times \text{Umrechnungsfaktor}$$

$T_{\text{leer}}$  = Masse des getrockneten Tiegels ohne Probe

$T_{\text{Probe}}$  = Masse des Tiegels mit Probe

$T_{\text{getrocknet}}$  = Masse des Tiegels mit Probe nach dem Trocknen

Berechnung des Wassergehaltes:

$$\text{Wassergehalt} = \frac{T_{\text{Probe}} - T_{\text{getrocknet}}}{T_{\text{Probe}} - T_{\text{leer}}} \times \text{Umrechnungsfaktor}$$

**Bestimmung des Glühverlustes der Trockenmasse nach DIN EN 12879**

Begriffserläuterung:

Glühverlust: Massenanteil, der beim Glühen der Trockenmasse eines Schlamms unter festgelegten Bedingungen als Gas entweicht.

Glührückstand: Massenanteil des Rückstandes nach dem Glühen der Trockenmasse eines Schlamms unter festgelegten Bedingungen.

Die Bestimmung wurde durchgeführt, indem ein leerer Tiegel im Muffelofen für mindestens 30 min auf 550 °C geglüht wurde. Nach Abkühlen im Exsikkator auf Raumtemperatur (ca. 15 min) wurde der Tiegel auf 1 mg genau gewogen.

Der Tiegel wurde mit der Probe gewogen und anschließend für mindestens 1 Stunde bei 550 °C geglüht. Nach Abkühlen im Exsikkator auf Raumtemperatur (ca. 15 min) wurde zum ersten Mal der Rückstand gewogen.

Die Probe wurde solange geglüht und gewogen, bis die Massenkonzanz erreicht war.

Berechnung des Glühverlustes der Trockenmasse:

$$\text{Glühverlust [\%]} = \frac{T_{\text{getrocknet}} - T_{\text{geglüht}}}{T_{\text{getrocknet}} - T_{\text{leer}}} \times 100$$

$T_{\text{leer}}$  = Masse des getrockneten Tiegels ohne Probe

$T_{\text{getrocknet}}$  = Masse des Tiegels mit Probe nach dem Trocknen

$T_{\text{geglüht}}$  = Masse des Tiegels mit Probe nach dem Glühen

Berechnung des Glührückstandes der Trockenmasse:

$$\text{Glührückstand [\%]} = 100 - \text{Glühverlust [\%]}$$

**3.2.2 Methoden der EPS-Isolierung**

Um die EPS zu isolieren wurden verschiedenen Methoden angewandt. In Anlehnung an Frølund et al. (1996) wurden dabei 8 g Trockenmasse (TM) pro Liter Phosphatpuffer pH 7 eingesetzt.

Um EPS von Reinkulturen (*P. aeruginosa* SG81) zu isolieren, wurden diese auf Agar-Medien angezüchtet und anschließend von der Agar-Oberfläche abgeschabt (siehe 3.1.2).

**3.2.2.1 EPS-Isolierung durch Rühren (Rühr-Methode)**

Die EPS-Isolierung durch Rühren (R) (Rühr-Methode) diente als Vergleichsmethode.

Die Probe wurde in Phosphatpuffer pH 7 suspendiert und mit ca. 500-600 RPM auf einem Magnetrührer bei 4 °C (Eisbad) für 1 Stunde gerührt. Nach beendeter Isolierung wurde die Probe 20 min mit 20.000 g und bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4 °C gegen 2 x 5 l deionisiertes Wasser dialysiert (Ausschlussgrenze 12 - 14 kD).

**3.2.2.2 EPS-Isolierung mit einem Vortex**

Die Probe wurde in einen 50 ml Falcontube eingewogen und in Phosphatpuffer pH 7 suspendiert und 2 x 10 min auf einem Vortex bei Raumtemperatur (RT) und maximaler Stufe behandelt (siehe Abb. 10). Nach beendeter Isolierung wurde die Probe 20 min mit 20.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4 °C gegen 2 x 5 l deionisiertes Wasser dialysiert (Ausschlussgrenze 12 - 14 kD).

**3.2.2.3 EPS-Isolierung mit dem Kationentauscher Dowex**

In Anlehnung an Frølund et al. (1996) wurden 70 g Dowex pro g TM für die EPS-Isolierung verwendet. (Dowex = Kationentauscherharz)

Bei Trinkwasserbiofilmen wurde 2 g Dowex /10 ml Biofilmsuspension verwendet.

Das Kationentauscherharz Dowex besteht aus einem Basisgerüst aus di-vinyl-Benzol und Substituenten sind Sulfonsäuregruppen (Herstellerangabe). Die Ionenselektivität wurde von Bonner und Smith (1957) untersucht. Hier zeigte sich, dass die Selektivität von Dowex 50 für zweiwertige Kationen wie folgt ist:

Ba > Pb > Sr > Ca > Ni > Cd > Cu > Co > Zn > Mg > UO<sub>2</sub>

Um das Dowex einsetzen zu können, wurde es 2-mal für 15 min mit Phosphatpuffer pH 7 unter Rühren gewaschen, um mögliche Verunreinigung zu entfernen und das Dowex vollständig zu hydratisieren. Nach dem Waschen wurde der Puffer abdekantiert. Das so vorbehandelte Dowex wurde dann entsprechend eingewogen (70 g Dowex pro g TM).

Die EPS-Isolierung mit Dowex (D) (Dowex-Methode) erfolgte in Anlehnung an Frølund et al. (1996).

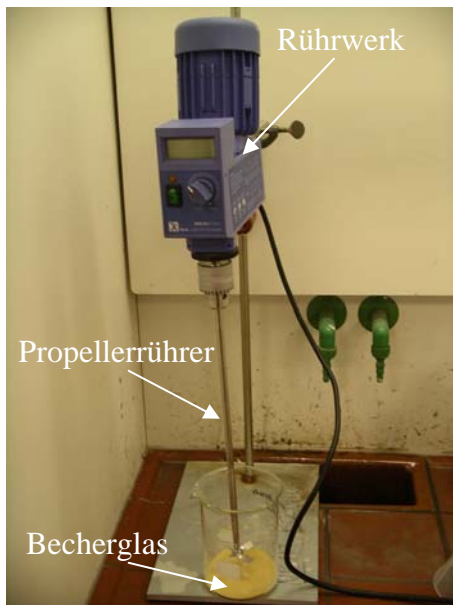


Abb. 9:  
Dowex-EPS-Isolierung

Die Probe wurde in ein 600-ml-Becherglas eingewogen, in Phosphatpuffer pH 7 suspendiert, das Dowex hinzugefügt und 2 Stunden bei 900 RPM und 4 °C (Eisbad) mit einem Rührwerk (Propellerrührer) gerührt (siehe Abb. 9). Nach beendeter Isolierung und kurzer Sedimentationsphase wurde die Probe 2-mal 15 min mit 12.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4 °C gegen 2 x 5 l deionisiertes Wasser dialysiert (Ausschlussgrenze 12 - 14 kD).

#### Die EPS-Isolierung mit Dowex und Formaldehyd mit NaOH (DF+)

Die Probe wurde in ein 600-ml-Becherglas eingewogen, in Phosphatpuffer pH 7 suspendiert und das Dowex sowie 0,06 ml Formaldehyd (37 %) pro 10 ml Suspension zugeben.

Die Probe wurde für 30 min bei 900 RPM und 4 °C (Eisbad) mit einem Rührwerk (Propellerrührer) gerührt. Dann wurden 4 ml NaOH (1 M) pro 10 ml Suspension zugeben und für weitere 30 min bei 4 °C (Eisbad) gerührt. Nach dieser Zeit wurde eine Probe entnommen (DF+1h) und die verbliebene Probe für weitere 60 min bei 4 °C (Eisbad) gerührt (DF+ 2h) oder direkt 90 min gerührt (DF+). Nach beendeter Isolierung und kurzer Sedimentationsphase wurde die Probe 20 min mit 20.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4 °C gegen 2 x 5 l deionisiertes Wasser dialysiert (Ausschlussgrenze 12 - 14 kD).

### EPS-Isolierung mit Dowex miniaturisiert unter Verwendung eines Vortex (DV)

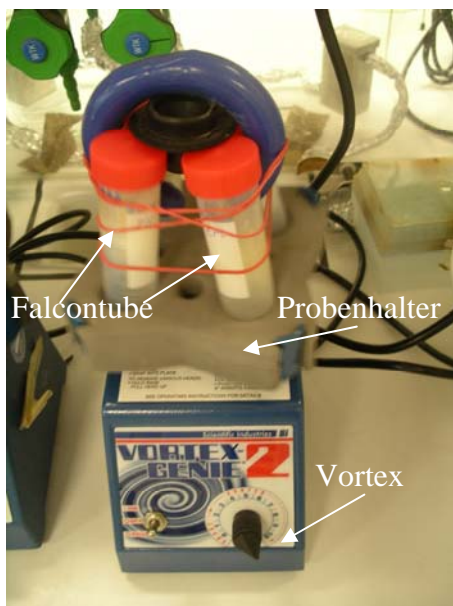


Abb. 10: Miniaturisierter EPS-Isolierung mit Dowex.

Die Probe wurde in einen 50-ml-Falcontube eingewogen, in Phosphatpuffer pH 7 suspendiert, das Dowex hinzugefügt und 2 x 10 min auf einem Vortex bei Raumtemperatur (RT) und maximaler Stufe behandelt (siehe Abb. 10). Nach beendeter Isolierung wurde die Probe 20 min mit 20.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4 °C gegen 2 x 5 l deionisiertes Wasser dialysiert (Ausschlussgrenze 12 - 14 kD).

### EPS-Isolierung mit Dowex und Formaldehyd mit NaOH unter Verwendung eines Vortex (DVF+)

Die Probe wurde in einen 50-ml-Falcontube eingewogen, in Phosphatpuffer pH 7 suspendiert, 0,06 ml Formaldehyd (37 %) pro 10 ml Lösung und das Dowex hinzugefügt. Nach 10 min auf einem Vortex bei RT und maximaler Stufe wurden 4 ml NaOH (1 M) pro 10 ml Lösung zugeben und die Probe weitere 10 min auf einem Vortex behandelt. Nach beendeter Isolierung wurde 20 min mit 20.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4 °C gegen 2 x 5 l deionisiertes Wasser dialysiert (Ausschlussgrenze 12 - 14 kD).

#### 3.2.2.4 EPS-Isolierung mit Formaldehyd mit und ohne NaOH

Die EPS-Isolierung mit Formaldehyd (F) (Formaldehyd-Methode) erfolgte nach Liu und Fang (2002).

Die Probe wurde eingewogen und in Phosphatpuffer pH 7 suspendiert. Zu der Suspension wurden 0,06 ml Formaldehyd (37 %) pro 10 ml Suspension zugeben. Dieses Gemisch wurde mit ca. 500 - 600 RPM auf einem Magnetrührer bei 4 °C (Eisbad) für 1 Stunde gerührt. Nach beendeter Isolierung wurde die Probe 20 min mit 20.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4 °C gegen 2 x 5 l deionisiertes Wasser dialysiert (Ausschlussgrenze 12 - 14 kD).

Die EPS-Isolierung mit Formaldehyd mit NaOH (F+) (Formaldehyd-NaOH-Methode) erfolgte nach Liu und Fang (2002).

Die Probe wurde eingewogen und in Phosphatpuffer pH 7 suspendiert. Zu der Suspension wurden 0,06 ml Formaldehyd (37 %) pro 10 ml Suspension zugeben. Dieses Gemisch wurde mit ca. 500 - 600 RPM auf einem Magnetrührer bei 4 °C (Eisbad) für 1 Stunde gerührt. Dann wurden 4 ml NaOH (1 M) pro 10 ml Suspension zugeben und für weitere 3 Stunden bei 4 °C (Eisbad) gerührt. Nach beendeter Isolierung wurde die Probe 20 min mit 20.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4 °C gegen 2 x 5 l deionisiertes Wasser dialysiert (Ausschlussgrenze 12 - 14 kD).

### 3.2.2.5 EPS-Isolierung mit dem Stomacher

Bei dem Stomacher (siehe Abb. 11) handelt es sich um ein Gerät, welches häufig in der Lebensmittel-Analytik zum Einsatz kommt. Durch die beiden Paddel wird die Probe wechselseitig über die Sperre gedrückt. Hierbei entstehen hohe Scherkräfte. Diese Methode wurde auch schon zur Ablösung und Homogenisierung von Biofilmpollen eingesetzt (z. B.: Gagnon und Slawson 1999, Fry et al. 1985).

EPS-Isolierung mit dem Stomacher (S) (Stomacher-Methode)

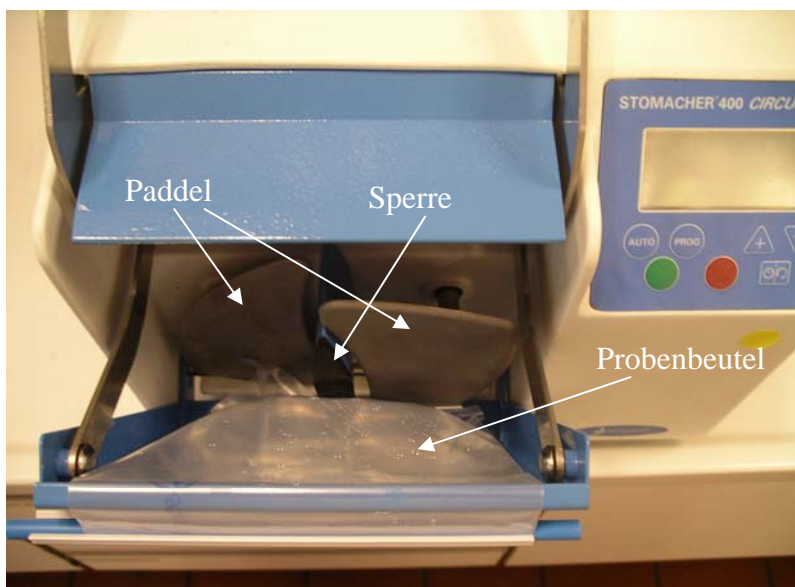


Abb. 11: Stomacher mit Probenbeutel

Die Probe wurde in den Stomacherbeutel eingewogen und die entsprechende Menge an Phosphatpuffer pH 7 hinzugegeben. Die Probe wurde 15 min bei 200 RPM und RT mit einem Stomacher behandelt. Nach beendeter Isolierung wurde die Probe 20 min mit 20.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und

bei 4 °C gegen 2 x 5 l deionisiertes Wasser dialysiert (Ausschlussgrenze 12 - 14 kD).

### EPS-Isolierung mit Stomacher und Dowex (SD)

Die Probe wurde in den Stomacherbeutel eingewogen, die entsprechende Menge an Phosphatpuffer pH 7 hinzugegeben und das Dowex eingefüllt. Die Probe wurde 15 min bei 200 RPM und RT mit einem Stomacher behandelt. Nach beendeter Isolierung und kurzer Sedimentationsphase wurde die Probe 20 min mit 20.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4 °C gegen 2 x 5 l deionisiertes Wasser dialysiert (Ausschlussgrenze 12 - 14 kD).

### EPS-Isolierung mit Stomacher, Dowex und Formaldehyd mit NaOH (SDF+)

Die Probe wurde in den Stomacherbeutel eingewogen, die entsprechende Menge an Phosphatpuffer pH 7 hinzugegeben, das Dowex eingefüllt und 0,06 ml Formaldehyd (37 %) pro 10 ml Suspension zugeben. Die Probe wurde 10 min bei 200 RPM und RT mit einem Stomacher behandelt. Danach wurden 4 ml NaOH (1 M) pro 10 ml Suspension zugeben und für weitere 10 min bei 200 RPM und RT mit einem Stomacher behandelt. Nach beendeter Isolierung und kurzer Sedimentationsphase wurde die Probe 20 min mit 20.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4 °C gegen 2 x 5 l deionisiertes Wasser dialysiert (Ausschlussgrenze 12 - 14 kD).

## 3.2.3 EPS-Analytik

### 3.2.3.1 Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes

Die Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes erfolgte nach Dubois et al. (1956).

5 %ige Phenol-Lösung  $\Rightarrow$  5 g Phenol werden im Abzug in 100 ml deionisiertem Wasser gelöst.

#### Durchführung:

Von jeder Probe wurde ein Dreifachansatz angefertigt. Hierzu wurden 0,5 ml der Probe und 0,5 ml einer 5 % (w/v) Phenol-Lösung in einem Reagenzglas vorsichtig gemischt. So schnell wie möglich wurden 2,5 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzugegeben und es wurde erneut gemischt. Nach einer Reaktionszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurden die Proben für 15 min bei 30 °C temperiert. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Ansätze bei 480/490 nm gemessen. Die Messungen erfolgten gegen deionisiertes Wasser. Gleichzeitig mit den anderen Proben wurde eine Dreifachbestimmung des verwendeten deionisierten Wassers, wie oben beschrieben, durchgeführt und so der Blindwert ermittelt. Kalibriert wurde anhand einer Dreipunkt-Kalibrierung. Bei Umweltproben wurde jeweils aus einer Stammlösung von 200 µg/ml D-(+)-Glucose oder 200 µg/ml Glucuronsäure in deionisiertem Wasser Kalibrationsproben von 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml der

jeweiligen Referenz angesetzt und, wie oben beschrieben, gleichzeitig Dreifachansätze mit den anderen Proben bearbeitet.

Bei Reinkulturen von *P. aeruginosa* SG81 wurde jeweils aus einer Stammlösung von 200 µg/ml Alginat in deionisiertem Wasser Kalibrationsproben von 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml angesetzt und wie oben beschrieben gleichzeitig Dreifachansätze mit den anderen Proben bearbeitet.

Die 3 erhaltenen Messwerte je Probe wurden durch ihren Mittelwert angegeben. Anhand der Geraden aus der Dreipunkt-Kalibrierung und dem Wert des deionisierten Wassers ließen sich die zugehörigen Kohlenhydratwerte pro ml der Proben errechnen.

### 3.2.3.1.1 Bestimmung des Uronsäuregehaltes

Die Bestimmung des Uronsäuregehaltes erfolgte nach Filisetti-Cozzi und Carpita (1991).

Lösung 1  $\Rightarrow$  4 M Sulfaminsäure:

19,42 g Sulfaminsäure wurden in 20 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit gesättigter KOH-Lösung der pH auf 1,6 eingestellt. Anschließend wurde der Ansatz mit deionisiertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt.

Lösung 2  $\Rightarrow$  0,075 M Natriumtetraborat-Decahydrat Lösung:

5,7206 g Natriumtetraborat-Decahydrat wurde in 200 ml konzentrierter Schwefelsäure gelöst.

Lösung 3  $\Rightarrow$  0,15 % (w/v) m-Hydroxybiphenyl Lösung:

15 mg m-Hydroxybiphenyl wurden in 10 ml 0,5 %iger (w/v) NaOH-Lösung gelöst.

#### Durchführung:

Von jeder Probe wurde ein Dreifachansatz angefertigt. Zu 0,4 ml Probe bzw. deionisiertem Wasser (Blindwert) wurden jeweils 40 µl Lösung 1 pipettiert und auf dem Reagenzglasschüttler gemischt. Dann wurden 2,4 ml Lösung 2 zugegeben und erneut auf einem Reagenzglasschüttler gemischt. Anschließend wurden die Ansätze für 20 min bei 98 °C im Wasserbad erhitzt. Dann wurden die Proben für 5 min im Eisbad abgekühlt und es wurden 80 µl Lösung 3 hinzugegeben. Die Proben wurden auf dem Reagenzglasschüttler gemischt und nach 10 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption aller Ansätze bei 525 nm im Photometer gegen deionisiertes Wasser gemessen. Gleichzeitig mit den anderen Proben wurde eine Dreifachbestimmung des verwendeten deionisierten Wassers, wie oben beschrieben, durchgeführt und so der Blindwert ermittelt. Kalibriert wurde anhand einer Dreipunkt-Kalibrierung. Hierzu wurde jeweils aus einer Stammlösung von 200 µg/ml Glucuronsäure oder Alginat in deionisiertem Wasser Kalibrationsproben von 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml der jeweiligen Referenz angesetzt und wie oben



beschrieben gleichzeitig Dreifachansätze mit den anderen Proben bearbeitet. Die 3 erhaltenen Messwerte je Probe wurden durch ihren Mittelwert angegeben. Anhand der Geraden aus der Dreipunkt-Kalibrierung und dem Wert des deionisierten Wassers ließen sich die zugehörigen Uronsäurewerte pro ml der Proben errechnen.

### **3.2.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes**

#### **3.2.3.2.1 Bestimmung des Proteingehaltes mit NanoOrange**

Die Bestimmung des Proteingehaltes mit NanoOrange wurde mit dem NanoOrange® Protein Quantitation Kit nach Herstelleranweisung durchgeführt.

Komponente A (500x) [NanoOrange protein quantitation reagent]

Komponente B (10x) [NanoOrange protein quantitation diluent]

Komponente C 2 mg/ml BSA

#### Durchführung:

Alle Komponenten wurden auf Raumtemperatur (RT) gebracht. Komponente A wurde vor der Benutzung kurz zentrifugiert.

Um Lösung B herzustellen, wurde die Komponente B 1:10 in deionisiertem Wasser verdünnt. Komponente A wurde 1:500 mit Lösung B verdünnt und musste lichtgeschützt aufbewahrt werden. Hieraus ergab sich das Arbeitsreagenz. Das Ansetzen der Proben erfolgte in Kunststoff-Röhrchen (PP = Polypropylen) mit Deckel, die mit Alu-Folie lichtdicht ummantelt wurden. Die Proben wurden mindestens 1:24 mit Arbeitsreagenz verdünnt. Die so erhaltenen Proben wurden 10 min bei 95 °C und Dunkelheit erhitzen. Anschließend mussten die Proben 20 min bei Dunkelheit auf RT abkühlen.

Für die Fluoreszenzmessung wurden 2 ml der behandelten Probe in eine PMMA-Einmalküvette überführen und gemessen. Die Messung erfolgte mit einer Excitation von 485 nm und einer Emission bei 590 nm. Als Detektionsmaximum wurde die maximale Konzentration der Kalibration verwendet. Als 0-Wert bei der Kalibration wurde die Arbeitslösung ohne BSA-Zusatz verwendet. Um einen stabileren Messwert zu erhalten, wurde der Mittelwert über 8 sec. erfasst.

### 3.2.3.2.2 Bestimmung des Proteingehaltes in Anlehnung an Lowry

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mit einer modifizierten Lowry-Methode nach Frølund et al. (1995).

Lösung A  $\Rightarrow$  5,72 g/l NaOH (0,143 M) und 28,62 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,270 M) wurden in deionisiertem Wasser gelöst.

Lösung B  $\Rightarrow$  14,23 g/l CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O (0,057 M) wurden in deionisiertem Wasser gelöst.

Lösung C  $\Rightarrow$  28,53 g/l Na<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (0,124 M) (Na-tartrat) wurden in deionisiertem Wasser gelöst.

Arbeitsreagenz  $\Rightarrow$  Lösung A, B und C wurden im Verhältnis 100:1:1 gemischt. Die Lösungen wurden vor Gebrauch frisch angesetzt.

#### Durchführung:

Von jeder Probe wurde ein Dreifachansatz angefertigt. Hierzu wurden alle Proben mit SDS (1 % Endkonzentration) versetzt. 0,5 ml der Probe (mit 1 % SDS) wurden mit 0,7 ml Arbeitsreagenz versetzt und vorsichtig gemischt. Nach einer Reaktionszeit von 20 min bei Raumtemperatur wurden zu jedem Ansatz 0,1 ml eines Gemisches aus 5 Teilen Folin & Ciocalteu's Phenolreagenz und 6 Teilen deionisiertem Wasser gegeben und die Ansätze vorsichtig gemischt. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Ansätze bei 750 nm gemessen. Die Messung erfolgte gegen deionisiertes Wasser. Gleichzeitig mit den anderen Proben wurde eine Dreifachbestimmung des verwendeten deionisierten Wassers, wie oben beschrieben, durchgeführt und so der Blindwert ermittelt. Kalibriert wurde anhand einer Dreipunkt-Kalibrierung. Hierzu wurde aus einer Stammlösung von 200 µg/ml Rinderserumalbumin (BSA) in deionisiertem Wasser Kalibrationsproben von 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml BSA (in 1 % SDS) angesetzt und wie oben beschrieben gleichzeitig Dreifachansätze mit den anderen Proben bearbeitet. Die 3 erhaltenen Messwerte je Probe wurden durch ihren Mittelwert angegeben. Anhand der Geraden aus der Dreipunkt-Kalibrierung und dem Wert des deionisierten Wassers ließen sich die zugehörigen Proteinwerte pro ml der Proben errechnen.

### 3.2.3.3 Bestimmung des Huminstoffgehaltes

Die Bestimmung des Huminstoffgehaltes erfolgte nach Frølund et al. (1996).

Lösung A  $\Rightarrow$  5,72 g/l NaOH (0,143 M) und 28,62 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,270 M) in deionisiertem Wasser lösen.

Lösung C  $\Rightarrow$  28,53 g/l Na<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (0,124 M) (Natriumtartrat) in deionisiertem Wasser lösen.

Lösung D  $\Rightarrow$  deionisiertes Wasser

Arbeitsreagenz  $\Rightarrow$  Lösung A, C und D wurden im Verhältnis 100:1:1 gemischt.  
Die Lösungen wurden vor Gebrauch frisch angesetzt.

#### Durchführung:

Von jeder Probe wurde ein Dreifachansatz angefertigt. Hierzu wurden 0,5 ml Probe mit 0,7 ml Arbeitsreagenz versetzt und vorsichtig gemischt. Nach einer Reaktionszeit von 20 min bei Raumtemperatur wurden zu jedem Ansatz 0,1 ml eines Gemisches aus 5 Teilen Folin & Ciocalteu's Phenolreagenz und 6 Teilen deionisiertem Wasser gegeben und die Ansätze vorsichtig gemischt. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Ansätze bei 750 nm gemessen. Die Messung erfolgte gegen deionisiertes Wasser. Gleichzeitig mit den anderen Proben wurde eine Dreifachbestimmung des verwendeten deionisierten Wassers, wie oben beschrieben, durchgeführt und so der Blindwert ermittelt. Kalibriert wurde anhand einer Dreipunkt-Kalibrierung. Hierzu wurde aus einer Stammlösung von 100 µg/ml Huminsäure in deionisiertem Wasser Kalibrationsproben von 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml Huminsäure angesetzt und wie oben beschrieben gleichzeitig Dreifachansätze mit den anderen Proben bearbeitet. Die 3 erhaltenen Messwerte je Probe wurden durch ihren Mittelwert angegeben. Anhand der Geraden aus der Dreipunkt-Kalibrierung und dem Wert des deionisierten Wassers ließen sich die zugehörigen Huminstoffwert pro ml der Proben errechnen.

Die Berechnung des Huminstoff- und Proteingehaltes erfolgt nach Frølund et al. (1995).

$$A_{\text{Protein}} = 1,25 \times (A_{\text{Protein, gemessen}} - A_{\text{Humin, gemessen}})$$

$$A_{\text{Humin}} = A_{\text{Humin, gemessen}} - 0,2 \times A_{\text{Protein}}$$

A = Absorption

### 3.2.3.4 Bestimmung des DNA-Gehaltes

Bestimmung des DNA-Gehalts erfolgte nach Brunk et al. (1979).

#### DAPI-Stammlösung:

10 µg/ml DAPI wurde in sterilfiltriertem (0,2 µm) Tris/HCl-EDTA-Puffer gelöst. (Hierbei handelte es sich um eine lichtempfindliche Lösung, die im Kühlschrank aufbewahrt wurde)

#### DAPI-Arbeitslösung:

Die DAPI-Stammlösung wurde 1:32 in sterilfiltriertem Tris/HCl-EDTA-Puffer verdünnt  
⇒ 0,3 µg/ml DAPI (Lichtempfindlich)

#### DNA-Stammlösung:

200 µg/ml DNA wurden in sterilfiltriertem deionisiertem Wasser gelöst.

#### DNA-Arbeitslösung:

Die DNA-Stammlösung wurde 1:10 in sterilfiltriertem deionisiertem Wasser verdünnt  
⇒ 20 µg/ml

#### Durchführung:

Am Fluorimeter wurden folgende Parameter eingestellt:

$\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$  (Anregungswellenlänge)

$\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$  (Emissionswellenlänge)

Reagenzgläser aus Kunststoff, die mit Aluminiumfolie umwickelt sind, wurden für alle Proben verwendet. Alle Lösungen die DAPI enthielten, wurden zur Entsorgung über Aktivkohle filtriert.

Zur einfacheren Bearbeitung wurden 2 ml Tris/HCl-EDTA-Puffer mit 1 ml DAPI-Arbeitslösung, bzw. nur 3 ml Tris/HCl-EDTA-Puffer (Eigenfluoreszenz) in Reagenzgläser aus Kunststoff, die mit Aluminiumfolie umwickelt waren, vorbereitet.

Zur Einstellung der relativen Fluoreszenz am Fluorimeter wurden 2 ml Tris/HCl-EDTA-Puffer, 1 ml DAPI-Arbeitslösung, 75 µl Probe und 75 µl DNA-Arbeitslösung gemischt und in einer Vollküvette in dem Fluorimeter gemessen. Die relative Fluoreszenz dieser Probe wurde auf den Wert 150 gesetzt.

2 ml Tris/HCl-EDTA-Puffer und 1 ml DAPI-Arbeitslösung wurden in einer Vollküvette vorgelegt. Die Blindwertkorrektur (autoblack) wurde nun vorgenommen. 15 µl der Probe wurden zugegeben, die Suspension mittels 1 ml Kolbenhubpipette gemischt und die Fluoreszenzintensität gemessen. Weitere 4 Aliquote (je 15 µl) der Probe wurden wie oben beschrieben zugegeben und gemessen. Danach wurden 15 µl der

DNA-Arbeitslösung zugegeben, die Lösung mittels 1 ml Kolbenhubpipette gemischt und die Fluoreszenzintensität gemessen. Weitere 4 Aliquote (je 15 µl) der DNA-Arbeitslösung wurden wie oben beschrieben zugegeben und gemessen.

Die Eigenfluoreszenz der Probe wurde ohne DAPI-Arbeitslösung gemessen. Hierzu wurde von 3 ml Tris/HCl-EDTA-Puffer die Blindwertkorrektur durchgeführt und dann nacheinander 5-mal jeweils 15 µl der Probe hinzugegeben und die Fluoreszenzintensität gemessen.

Aus den Messpunkten ergeben sich durch lineare Regression 3 Geraden, durch deren Steigung konnte die unbekannte Nucleinsäure-Konzentration der Probe berechnet werden.

### **3.2.3.5 Bestimmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenaseaktivität**

Bestimmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenaseaktivität erfolgte nach Ng und Dawes (1972).

5,64 mg/ml (20 mM) Glucose-6-phosphat wurden in sterilfiltriertem autoklaviertem deionisiertem Wasser gelöst.

7,65 mg/ml (10 mM)  $\beta$ -NADP wurden in sterilfiltriertem autoklaviertem deionisiertem Wasser gelöst.

5,08 g (250 mM)  $MgCl_2$  wurden in 100 ml sterilfiltriertem autoklaviertem deionisiertem Wasser gelöst.

#### Substratlösung:

0,5 ml 120 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,6), 0,375 ml frisch hergestellte 20 mM Glucose-6-phosphat-Lösung, 0,25 ml 10 mM  $\beta$ -NADP-Lösung, 0,09 ml 250 mM  $MgCl_2$ -Lösung und 0,235 ml deionisiertem Wasser wurden gemischt.

#### Durchführung:

Es wurden 50 µl Probelösung und 1,45 ml Substratlösung gemischt und bis zu 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Zunahme der Absorption bei 340 nm alle 15 min gemessen. Eine kommerzielle Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (aus *Leuconostoc mesenteroides*, Sigma) wurde zu 1 µg/ml und 0,1 µg/ml in deionisiertem Wasser gelöst und als Positivkontrolle parallel in gleicher Weise behandelt.

### 3.3 Einnistungsexperimente

#### 3.3.1 Trinkwasseruntersuchungen

Das für die Einnistungsexperimente verwendete Trinkwasser der Hausinstallation der Universität Duisburg-Essen, Geibelstrasse 41, Labor U123 wurde anhand verschiedener physikalisch-chemischer Parameter (Temperatur, Kupfergehalt, Chlorgehalt) und mikrobiologischer Parameter (Vorkommen von *P. aeruginosa*, siehe 3.3.3.2.2) charakterisiert.

Die Temperatur des Trinkwassers wurde sporadisch nach 30 min. Vorlaufzeit bestimmt.

Die Bestimmung des Kupfergehaltes im Trinkwasser wurde am Rheinisch Westfälischen Institut für Wasserforschung (IWW) nach DIN EN ISO 11885 durchgeführt. Der Kupfergehalt wurde von Trinkwasserproben bestimmt, nachdem dass Trinkwasser mindestens 30 min an der Probenahmestelle abgelaufen war.

Der Chlorgehalt wurde sporadisch in dem verwendeten Trinkwasser gemessen. Dazu wurde das Messgerät mit dem beprobten Trinkwasser kalibriert. Die Bestimmung des Chlorgehaltes erfolgte nach Herstellerangaben durch Zudosierung der Chemikalien Oxycon Start und Oxycon DPD.

#### 3.3.2 Biofilmanzucht und Einnistung

##### 3.3.2.1 Kleinreaktor

Um Biofilme auf Oberflächen im Trinkwasserdurchfluss anzuzüchten, wurde ein handelsüblicher Färbetrog mit einem unten gelegenen Zulauf und einem oben gelegenen Ablauf versehen (siehe Abb. 12). In diesem Kleinreaktor konnten 7 Coupons (72 mm x 26 mm x 1 mm) in einem Abstand von ca. 5 mm eingestellt werden. Um einen Kontakt der Coupons miteinander zu vermeiden, wurden diese mit einem Kamm arretiert.

Das Betriebsinnenvolumen des Reaktors betrug ca. 80 ml bis zu der Höhe des Ablaufes. Um die Verteilung innerhalb des Reaktors zu verbessern, wurden 2 Glasstege (46 mm Länge, 2,6 mm Ø) auf den Boden des Reaktors gelegt (Bressler 2002).

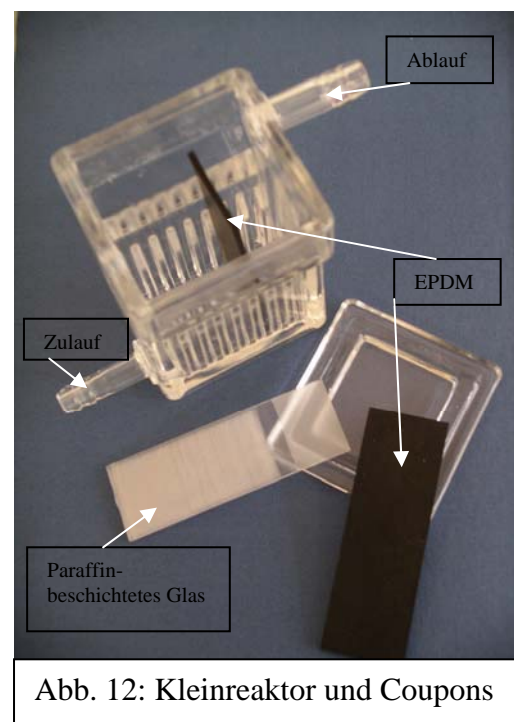


Abb. 12: Kleinreaktor und Coupons

### 3.3.2.2 Einrichtung und Betrieb des Kleinreaktors

Der Kleinreaktor mit Deckel und die Zu- und Ablaufschläuche wurden mit Aluminiumfolie lichtdicht ummantelt. Die Schläuche wurden an den Reaktor angeschlossen, an den Enden mit Klemmen wasserdicht verschlossen und die Glasstege in den Reaktor gelegt. Eine 1 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung wurde in den Reaktor gefüllt und der Verschluss des Zulaufes geöffnet. Nachdem ca. 50 ml der Wasserstoffperoxid-Lösung durch den Schlauch geflossen waren, wurde dieser wieder verschlossen. Anschließend wurde der Ablaufschlauch geöffnet und durch wiederholtes Auffüllen des Reaktors mit Wasserstoffperoxid-Lösung über die Ablaufhöhe wurde auch der Ablaufschlauch entsprechend gespült und wieder verschlossen. Die Wasserstoffperoxid-Lösung verblieb über Nacht in dem Reaktor. Mindestens 1 Stunde vor der Bestückung des Reaktors mit den Coupons wurde der Reaktor an die Trinkwasserleitung angeschlossen und mit Trinkwasser durchströmt (siehe Abb. 13). Die EPDM-Coupons wurden mit deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend 10 min bei 80 °C pasteurisiert (Madigan et al. 2002). Anschließend wurden die Coupons in den Reaktor eingesetzt und mit dem Kamm arretiert. Es wurde ein Durchfluss von 50 ml/min angestrebt. Die Biofilme aus Trinkwasserbakterien wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen angezüchtet.

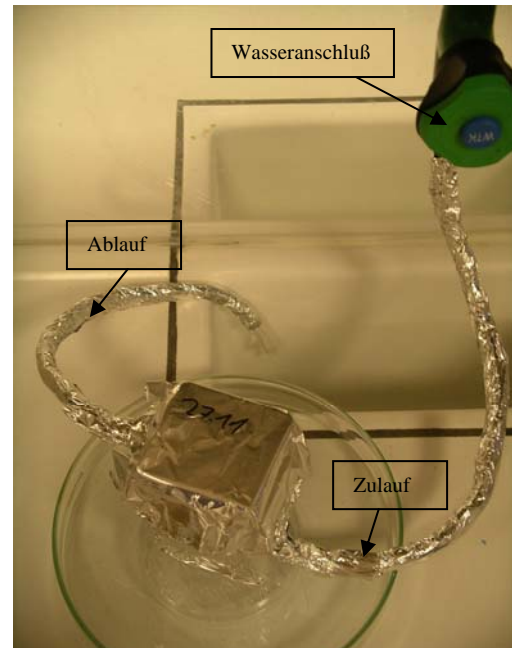


Abb. 13: Kleinreaktor in Betrieb

### 3.3.2.3 Inokulierung und Beprobung der Biofilme

Nach vierzehntägiger Biofilmanzucht wurden die Biofilme mit *P. aeruginosa* beimpft. Hierzu wurden Suspensionen aus den zuvor angezüchteten *P. aeruginosa* - Kulturen (siehe 3.1.3.) in partikelfreiem sterilem deionisiertem Wasser hergestellt, indem Bakterienmaterial suspendiert und die Absorption bei 600 nm ( $A_{600}$ ) bestimmt wurde. Dabei galt es eine  $A_{600}$  von 0,3 einzustellen, was einer Zellzahl von ca.  $10^8$  Zellen/ml

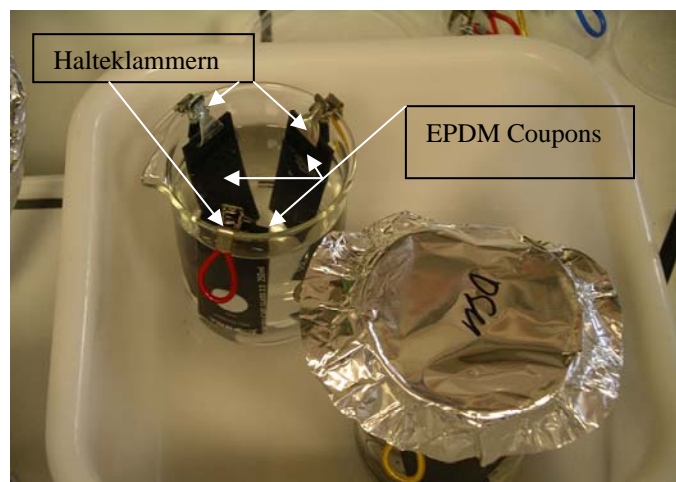


Abb. 14: Stagnationsansätze in Bechergläsern

entsprach. Frisch entnommenes Trinkwasser (Vorlaufzeit mindestens 30 min) wurde beprobt und anschließend mit 0,3 g CASO-Bouillon pro Liter (entspricht 1:100 CASO) versetzt und sterilfiltriert. Als Testsystem zur Simulation von Stagnationsbedingungen wurden 250 ml Bechergläser verwendet, in die die Coupons eingehängt wurden. Pro Becherglasansatz wurden 230 ml der Lösung (1:100 CASO) mit 2 ml der Bakteriensuspension gemischt. Die resultierende Suspension wurde beprobt und anschließend die mit Biofilm bewachsenen Coupons in die Suspension eingesetzt. Die Bechergläser wurden locker mit Aluminiumfolie abgedeckt (siehe Abb. 14).

Ein mit Biofilm bewachsener Coupon wurde als Kontrolle beprobt. Nach einer Inkubation von 1 Tag wurde die Suspension und anschließend je Ansatz ein Coupon beprobt. Die restlichen Coupons je Ansatz wurden in ein 250-ml-Becherglas mit 230 ml Trinkwasser überführt und verblieben dort für 7 Tage. Nach den 7 Tagen wurde das Trinkwasser beprobt und anschließend die Coupons entnommen und untersucht.

Um einen Biofilm zu untersuchen, wurde dieser von der EPDM-Oberfläche abgeschabt und in 10 ml sterilem deionisiertem Wasser suspendiert.

Die Parameter Gesamtzellzahl und die Koloniezahl auf R2A und CN-Agar wurden routinemäßig bestimmt.

### **3.3.3 Biofilmparameter**

#### **3.3.3.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl mit DAPI**

In Anlehnung an die Gesamtzellzahlbestimmung mittels DAPI-Färbung nach Porter und Feig (1980) wurden die zu färbenden Proben in Reagenzgläser überführt. Zu 4 ml der Probe wurde 1 ml DAPI-Arbeitslösung, mit einer Konzentration von 25 µg/ml DAPI in sterilfiltriertem deionisiertem Wasser mit 2 % Formaldehyd, zugegeben (Endkonzentration 5 µg/ml DAPI). Dieser Ansatz wurde 30 Sekunden mit dem Reagenzglasgemisch gemischt und 20 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe über einen schwarzen Polycarbonat-Filter ( $\varnothing = 25$  mm, Porengröße = 0,2 µm, Fa. Millipore) filtriert. Der Polycarbonat-Filter wurde mit einer Pinzette in eine Petrischale überführt. Bis zur Auswertung der Filter wurden diese in Aluminiumfolie lichtdicht verpackt und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Für die Auswertung wurden 20 Gesichtsfelder ausgezählt, bei denen Zellzahlen von 10 bis 100 pro Zählgitterfeld ausgezählt werden konnten. Um die Gesamtzellzahl pro ml zu erhalten, wurde der resultierende Mittelwert der Zellzahl mit dem filtrierten Probenvolumen und dem Gerätefaktor umgerechnet. Der Gerätefaktor ergab sich aus dem verwendeten Zählgittereinsatz im Mikroskop, der Vergrößerung des Objektivs und der Saugfläche auf dem Filter. Die Gesamtzellzahl pro cm<sup>2</sup> wurde ermittelt.



Gerätefaktor der Gesamtzellzahlbestimmung bei 2 verschiedenen Mikroskopen:

Gitternetz CLSM 12,5 mm x 12,5 mm

Bei 100x Objektiv:  $125 \mu\text{m} * 125 \mu\text{m} \Rightarrow 1,5625 * 10^{-4} \text{ cm}^2$

Saugfläche:  $1,6 \text{ cm } \varnothing \Rightarrow r = 0,8 \text{ cm} \Rightarrow A = \pi r^2 \Rightarrow A = 2,010619298 \text{ cm}^2$

Gerätefaktor: Saugfläche durch Gitternetz  
 $2,010619298 \text{ cm}^2 / 1,5625 * 10^{-4} \text{ cm}^2 = \underline{12868}$

Gitternetz Laborlux 10 mm x 10 mm

Bei 100x Objektiv:  $100 \mu\text{m} * 100 \mu\text{m} \Rightarrow 1 * 10^{-4} \text{ cm}^2$

Saugfläche:  $1,6 \text{ cm } \varnothing \Rightarrow r = 0,8 \text{ cm} \Rightarrow A = \pi r^2 \Rightarrow A = 2,010619298 \text{ cm}^2$

Gerätefaktor: Saugfläche durch Gitternetz  
 $2,010619298 \text{ cm}^2 / 1 * 10^{-4} \text{ cm}^2 = \underline{20106}$

Die Gesamtzellzahl wurde von Bakteriensuspensionen und Trinkwasser bestimmt.

### 3.3.3.2 Bestimmung der Koloniezahl

Agar-Platten mit 30 bis 300 Kolonien pro Agar-Platte wurden für die Auswertung herangezogen. Idealerweise wäre dies bei nur einer Verdünnung pro Probe gegeben. In Fällen, in denen dieses Kriterium bei mehr als einer Verdünnungsstufe gegeben war, wurde ein gewogener Mittelwert berechnet (Bast 1999).

#### 3.3.3.2.1 Bestimmung der Koloniezahl auf R2A-Medium

In Anlehnung an die Standardmethode des Heterotrophic-Plate-Count (Anonym, 1998) wurde die Koloniezahl von heterotrophen Trinkwasserbakterien auf R2A-Medium ermittelt. Hierzu wurden dezimale Verdünnungen der Proben bis  $10^{-7}$  in partikelfreiem sterilem deionisiertem Wasser hergestellt. Das Ausplattieren erfolgte, indem für eine Dreifachbestimmung jeweils 0,1 ml der Probenverdünnung mit einem sterilen Drigalskispatel auf dem Medium verteilt wurden. Nach einer Bebrütungszeit von 7 Tagen bei  $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde die Koloniezahl bestimmt und die KBE/cm<sup>2</sup> errechnet.

Die Koloniezahl auf R2A-Medium wurde von Biofilmsuspensionen ermittelt.

#### 3.3.3.2.2 Bestimmung der Koloniezahl auf CN-Medium

Um *P. aeruginosa* zu quantifizieren, wurde die Koloniezahl mit der Spatelplattenmethode ermittelt. Dazu wurden, aus derselben Verdünnungsreihe die für den HPC verwendet wurde (siehe 3.2.2.1), für eine Doppelbestimmung, jeweils 0,1 ml der Proben auf CN-Agar ausgespatelt. Um auch geringere Konzentrationen zu erfassen, konnte bis zu 0,5 ml der unverdünnten Probe ausplattiert werden. Die KBE/cm<sup>2</sup> bzw. KBE/ml wurde errechnet.

Die Koloniezahl auf CN-Medium wurde von Biofilmsuspensionen und dem Trinkwasser ermittelt.

### **3.3.4 Färbetechniken mit Fluoreszenzfarbstoffen**

#### **3.3.4.1 Visualisierung von Bakterien in Biofilmen**

Für die Visualisierung der Bakterien im Biofilm wurde hauptsächlich das LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit verwendet. Aus den Stammlösungen wurde eine Arbeitslösung erstellt. Dazu wurde 1 ml deionisiertes Wasser mit 1,5 µl der 3,34 mM SYTO 9 Stammlösung und 1,5 µl der 20 mM Propidiumiodid Stammlösung gemischt. Auf den Biofilm wurden 200 µl der Färbelösung aufgegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min unter Lichtausschluss wurde die restliche Flüssigkeit durch Aufrichten des Coupons entfernt. Die behandelte Couponseite wurde mit einem großen Deckglas versehen, um den gefärbten Biofilm vor Austrocknung zu schützen. Mit Aluminiumfolie wurde die Probe lichtundurchlässig verpackt und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Untersuchung erfolgte schnellstmöglich am CLSM.

Propidiumiodid sollte nur in membrangeschädigte Zellen eindringen. Hierbei konnte es zu einer Verdrängung des SYTO 9 Farbstoffes kommen, der für die Gesamtzell-Färbung eingesetzt wurde. Daraus resultierend sind SYTO 9 gefärbte Zellen (grün dargestellt) "lebende" Zellen und Propidiumiodid gefärbte Zellen (rot oder gelb dargestellt) "tot".

Gesamtzell-Färbungen wurden mit SYTO 9 und SYTO 62 durchgeführt.

Zellfärbungen mit SYTO 9:

Dazu wurde 1 ml deionisiertes Wasser mit 1,5 µl der 3,34 mM SYTO 9 Stammlösung gemischt. Die Färbung erfolgte wie zuvor beschrieben.

Zellfärbungen mit SYTO 62:

Dazu wurde 1 ml deionisiertes Wasser mit 1,5 µl der 5 mM SYTO 62 Stammlösung gemischt. Die Färbung erfolgte wie zuvor beschrieben.

#### **3.3.4.2 Visualisierung von EPS-Bestandteilen**

Auf die zu untersuchende Probe wurde, in Anlehnung an Strathmann et al. (2002), 200 µl der Färbelösung auf den Biofilm gegeben. Die Färbelösung enthielt 10 µg fluoreszenzmarkiertes Lektin in 1 ml Phosphat-Puffer pH 7,0 und 2 µl SYTO 62 DNA-Farbstoff. Nach einer Einwirkzeit von 20 min unter Lichtausschluss wurden die Proben mit 5 x 1 ml deionisiertem Wasser gespült, um ungebundene fluoreszenzmarkierte Lektine herauszuspülen, mit einem Deckglas versehen und lichtdicht verpackt. Anschließend wurden die Proben mit dem CLSM untersucht.

Es wurden folgende fluoreszenzmarkierte Lektine verwendet:

ConA – FITC (Anregungswellenlänge 488 nm)

WGA – FITC (Anregungswellenlänge 488 nm)

LecB – YFP (Anregungswellenlänge 488 nm)

### 3.3.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

#### 3.3.5.1 FISH auf Objektträgern

Die Fixierung der Proben erfolgte in Anlehnung an Manz et al. (1992.), die Hybridisierung entsprechend der in Tabelle 7 angegebenen Literatur.

##### Fixierung:

Die Probe (1,5 ml Bakteriensuspension) wurde 10 min bei 6000 g und 4 °C zentrifugiert um die Zellen anzureichern. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1,5 ml 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung suspendiert und 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurde die Suspension 5 min bei 6000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert (5 min, 6000 g, 4 °C) und das Pellet dann in einem 1:1 Gemisch aus Ethanol und PBS (phosphate buffered saline) suspendiert. In dieser Form wurde die Probe tiefgekühlt gelagert.

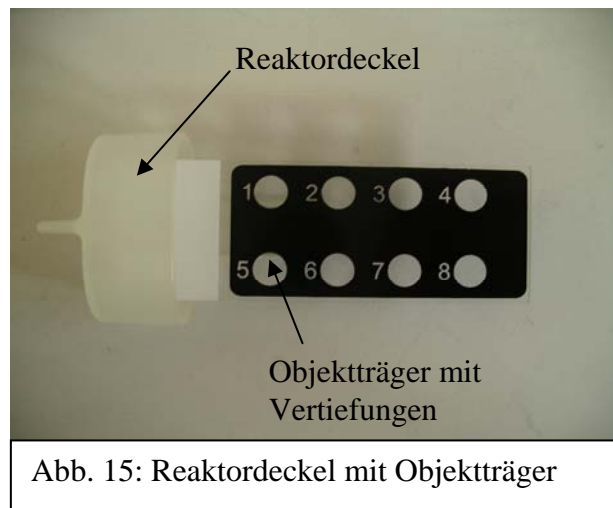


Abb. 15: Reaktordeckel mit Objektträger

##### Hybridisierung:

Für die Hybridisierung wurden je 10 µl der fixierten Proben in eine Vertiefung der Objektträger gegeben. Es wurden nur 4 der 8 Vertiefungen, jeweils versetzt (1, 3, 6, 8), verwendet, um ein Ineinanderlaufen der Proben zu verhindern (siehe Abb. 15). Die Proben wurden im Hybridisierungssofen getrocknet. Nach vollständiger Trocknung wurden die Objektträger (mit Probe) einer ethanolischen Reihe unterzogen. Hierzu wurden die Objektträger je 3 min in ein

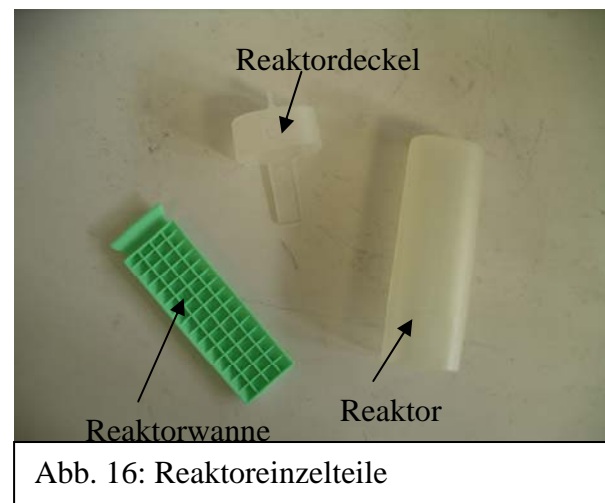


Abb. 16: Reaktoreinzelteile

Gemisch aus 50 %, 80 % und 96 % Ethanol in partikelfreiem sterilem deionisiertem Wasser getaucht. Nach vollständiger Trocknung wurde der Objektträger in dem Deckel eines Hybridisierungsreaktors befestigt (siehe Abb. 16).

Für die Hybridisierung wurde die Wanne des Hybridisierungsreaktors mit ca. 1 ml des Hybridisierungspuffers befüllt um ein Eintrocknen der Sonden zu verhindern (feuchte Kammer).

Die Sondenstamm-Lösung wurde in Hybridisierungspuffer 1:10 verdünnt (Endkonzentration 5 ng/µl). 10 µl der Sondenarbeits-Lösung wurden je Probenfeld aufgegeben und dann der Reaktor mit Wanne verschlossen. Die Reaktoren verblieben für die Hybridisierung 90 min bei 46 °C unter Lichtausschluss im Hybridisierungssofen. Um den Waschpuffer zu temperieren wurde dieser zeitgleich im Hybridisierungssofen vorgewärmt.

Nach beendeter Hybridisierung wurde der Reaktordeckel mit dem Objektträger auf den vorbereiteten Reaktor mit Waschpuffer überführt. Für den Waschschrift verblieb der Objektträger 15 min bei 46 °C unter Lichtausschluss im Hybridisierungssofen.

Nach Beendigung des Waschschriftes wurde der Objektträger kurz in eiskaltes deionisiertes Wasser getaucht. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit DAPI (1 µg/ml in PBS). Dazu wurde die Probe mit 10 µl DAPI-Lösung überschichtet und 20 min bei Dunkelheit inkubiert. Nach Beendigung der Färbung wurde die DAPI-Lösung durch Eintauchen in kaltes deionisiertes Wasser entfernt und die Probe mit Pressluft getrocknet.

### 3.3.5.2 FISH im Biofilm

#### Fixierung:

Der EPDM-Coupon mit Biofilm wurde auf einem Objektträger befestigt (siehe Abb. 17), mit 1 ml 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung überschichtet und 90 min bei 4 °C in einem geschlossenem Hybridisierungsreaktor inkubiert.

#### - Totaldehydratisierung:

Nach beendeter Fixierung wurde die Paraformaldehyd-Lösung mit 2 x 1 ml Ethanol (p. A.) abgespült und der Biofilm mit 1 ml Ethanol (p. A.) überschichtet und unter der Sterilwerkbank getrocknet.

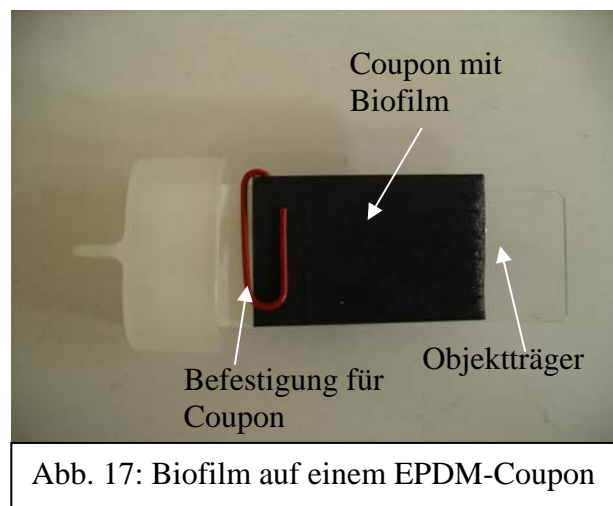


Abb. 17: Biofilm auf einem EPDM-Coupon

### - feuchter Biofilm

Nach beendeter Fixierung wurde die Paraformaldehyd-Lösung mit 2 x 1 ml Gemisch aus 1:1 Ethanol/PBS abgespült und der Biofilm mit 1 ml Gemisch aus 1:1 Ethanol/PBS überschichtet und 60 min bei 4 °C in einem geschlossenen Hybridisierungsreaktor inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurde das Gemisch aus 1:1 Ethanol/PBS mit 2 x 1 ml Hybridisierungspuffer abgespült.

### Hybridisierung:

Für die Hybridisierung wurde die Wanne des Hybridisierungsreaktors mit ca. 1 ml des Hybridisierungspuffers befüllt um ein Eintrocknen der Sonden zu verhindern (feuchte Kammer).

Die vorbereitete Biofilmprobe wurde mit 200 µl Sonden-Lösung betropft und der Hybridisierungsreaktor verschlossen. Die Reaktoren verblieben für die Hybridisierung 180 min bei 46 °C unter Lichtausschluss im Hybridisierungssofen. Um den Waschpuffer zu temperieren wurde dieser zeitgleich im Hybridisierungssofen vorgewärmt.

Nach beendeter Hybridisierung wurde der Reaktordeckel mit dem Objektträger auf den vorbereiteten Reaktor mit Waschpuffer überführt. Für den Waschschrift verblieb der Objektträger 15 min bei 46 °C unter Lichtausschluss im Hybridisierungssofen.

Nach Beendigung des Waschschriftes wurde der Objektträger kurz in eiskaltes deionisiertes Wasser getaucht. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit SYTO 9. Dazu wurde der Biofilm mit 200 µl SYTO 9-Lösung überschichtet und 20 min bei Dunkelheit inkubiert. Nach Beendigung der Färbung wurde die verbleibende SYTO 9-Lösung abgeschüttet.

### **3.3.5.3 Quantitative FISH auf Filtern**

#### Fixierung:

Die Probe wurde in einer Membranfiltrationsanlage auf einen weißen Polycarbonatfilter (0,2 µm) filtriert.

In den Hybridisierungsreaktor wurde ein "Absorbant Pad" eingelegt und der Probenfilter darauf mittig abgelegt. Auf Reaktordeckel und Boden wurden die Verschlusskappen aufgesetzt (siehe Abb. 18) und Deckel und Boden miteinander verschraubt. Im

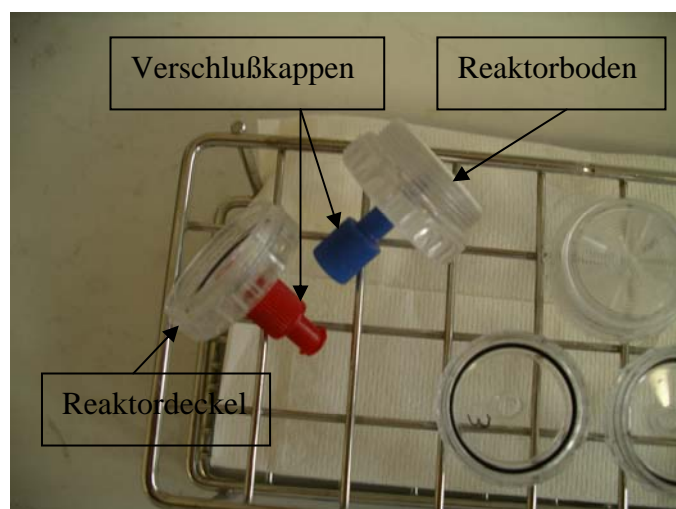


Abb. 18: Hybridisierungsreaktor für Filter

Abzug wurde der Probenfilter mit ca. 2 ml 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung überschichtet und 60 min bei 4 °C in einem geschlossenem Hybridisierungsreaktor inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurde die Paraformaldehyd-Lösung abgesaugt.

#### Ethanolische Reihe:

Der fixierte Probenfilter wurde auf ein neues "Absorbant Pad" aufgelegt und der Reaktor verschlossen (siehe Abb. 19).

Nacheinander wurde der Probenfilter 3 min jeweils mit einem Gemisch aus 50 %, 80 % und 96 % Ethanol/PBS überschichtet. Zwischen den einzelnen Schritten wurde der Überstand jeweils abgesaugt.

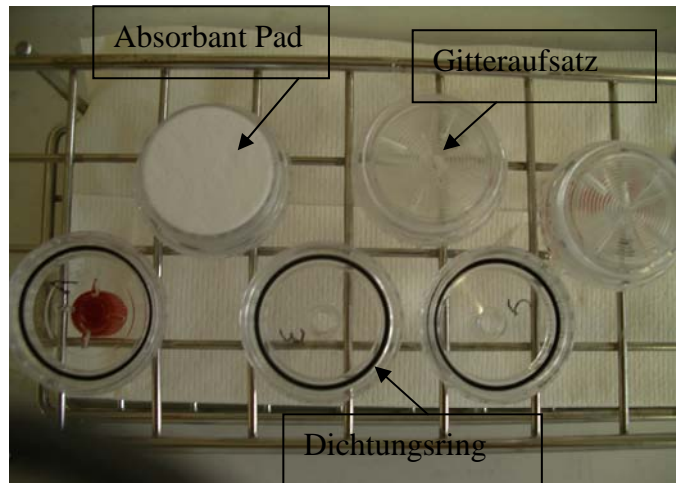


Abb. 19: Hybridisierungsreaktor für Filter

#### Hybridisierung:

Für die Hybridisierung wurde ein neues "Absorbant Pad" klein geschnitten, unter den Gitteraufsatz gelegt und im Abzug mit 0,3 ml Hybridisierungspuffer angefeuchtet. Der Probenfilter wurde mittig auf den Gitteraufsatz aufgelegt, mit 200 µl Sonden-Lösung betropft und der Hybridisierungsreaktor verschraubt. Die Reaktoren verblieben für die Hybridisierung 90 min bei 46 °C unter Lichtausschluss im Hybridisierungssofen. Um den Waschpuffer zu temperieren wurde dieser zeitgleich in einer Spritze im Hybridisierungssofen vorgewärmt.

Nach beendeter Hybridisierung wurde der Probenfilter mit temperiertem Waschpuffer mittels einer Spritze überschichtet und mit ca. 3 ml des Waschpuffers gespült. Für den Waschschrift verblieb der Hybridisierungsreaktor 15 min bei 46 °C unter Lichtausschluss im Hybridisierungssofen.

Nach Beendigung des Waschschriftes wurde der Waschpuffer mit 3 ml eiskaltem deionisiertem Wasser ausgespült und der verbleibende Überstand abgesaugt.

Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit DAPI. Hierzu wurde der Probenfilter mit 200 µl DAPI-Lösung (1 µg/ml in PBS) betropft und 20 min bei Dunkelheit inkubiert. Nach Beendigung der Färbung wurde die DAPI-Lösung mit kaltem deionisiertem Wasser ausgespült und der verbleibende Überstand abgesaugt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Evaluierung von Methoden für die EPS-Isolierung

Die EPS von Biofilmen bestehen aus verschiedenen Komponenten (Kohlenhydraten, Proteinen, DNA und ggf. Huminstoffen). Der Zusammenhalt der Matrix kann durch verschiedene kohäsive Wechselwirkungen wie elektrostatische Wechselwirkungen (ionischen- oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen), Wasserstoffbrückenbindungen, Entanglements und/oder hydrophobe Wechselwirkungen resultieren (z. B.: Mayer et al. 1999; Wloka et al. 2004). Aufgrund der verschiedenen kohäsiven Wechselwirkungen innerhalb der EPS ist es schwer vorauszusagen, wie sich die Matrix bei der EPS-Isolierung mit einer bestimmten Methode hinsichtlich Ausbeute und Zusammensetzung der EPS verhält.

Die Zusammensetzung der EPS, die sich isolieren lassen, ist meistens abhängig von der Isolierungsmethode (Flemming und Wingender 2002). Deshalb wurde die EPS-Isolierung bei Reinkultur- und Umweltbiofilmen mit verschiedenen Methoden (Dispergierung, Kationentauscher, Formaldehyd mit und ohne NaOH) untersucht, wobei die Methoden mit Kationentauscher (Dowex) oder NaOH schon häufig für EPS-Isolierungen verwendet wurden (siehe Tabelle 5 und 6). Ziel bei dieser Untersuchung war es, eine Methode zu finden, die eine möglichst hohe Ausbeute an EPS erzielte ohne dabei die Zellen zu lysieren. Um die Ausbeute an EPS bewerten zu können, wurden die Summenparameter von Kohlenhydraten, Proteinen und ggf. Huminstoffen bestimmt. Um einen Bezugspunkt für die Summenparameter der EPS zu erhalten, sind die Werte der Summenparameter auf ihren Anteil an der Trockenmasse (TM) oder auf den Glühverlust (GV) bezogen worden. Die Bestimmung der Summenparameter wurde als Messung gegen Referenzsubstanzen durchgeführt. Deshalb sind die Angaben als Äquivalent der Referenz anzusehen. Beispiel: Eine Angabe von 50 mg/g TM Protein ist als 50 mg/g TM BSA-Äquivalent anzusehen.

Bei den Umweltproben (Lysimeter-Schmutzdecken, Fließgewässerbiofilme, Biofilme aus der Papierherstellung und Trinkwasserbiofilme) wurden die Kohlenhydratwerte als Glucose-Äquivalent angegeben. Glucose ist ein in der Umwelt häufig vorkommendes Kohlenhydrat (Sutherland 2001).

Die isolierten Polymere sollten eine Mindestgröße aufweisen, deshalb wurde nach der Isolierung die Probe dialysiert. Hierzu wurde ein Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgrenze von kleiner 12.000 bis 14.000 Dalton verwendet. Bei Kohlenhydraten entsprach dies einer Mindestgröße von 65 Glucoseeinheiten.

In Anlehnung an Frølund et al. (1996) wurden bei der EPS-Isolierung 8 g Trockenmasse (TM) pro Liter Phosphatpuffer pH 7 eingesetzt.

#### 4.1.1 EPS-Isolierung von *P. aeruginosa*-Reinkulturen

Anhand eines definierten und kontrollierbaren Systems wurden Versuche der EPS-Isolierung an einer Reinkultur von *P. aeruginosa* SG81 durchgeführt. Dieser mucoide Stamm kann Alginat produzieren (Grobe et al. 1995). Alginat ist in der Lage, mit mehrwertigen Kationen (z. B.: Calcium) zu interagieren. Hierbei bilden sich mechanisch stabilere Biofilme als ohne diese Ionen (Körstgens et al. 2001).

Um den Effekt der Ionenverbrückung bezüglich der Ausbeute an EPS mit den verschiedenen Methoden zu untersuchen, wurde der Teststamm mit und ohne Calcium angezüchtet. Einmal auf dem Kultivierungsmedium PIA und des Weiteren auf PIA mit 0,1 mol/l  $\text{CaCl}_2$  (Ca-PIA). Dazu wurde *P. aeruginosa* SG81 über Nacht bei 36 °C auf dem Agar-Medium (PIA mit und ohne Ca) als konfluenten Biofilm angezüchtet. Diese Biofilme wurden abgeschabt und dann die EPS mit den verschiedenen Methoden isoliert. Als Bezugsgröße wurden die Trockenmasse (TM) und der Glühverlust (GV) der Biofilme bestimmt (siehe 3.2.1). Diese lagen bei *P. aeruginosa* SG81 auf PIA im Bereich von ca. 5,6 % für TM und ca. 4,5 % für GV (n = 6). Auf Ca-PIA waren für TM ca. 8,8 % und für GV ca. 6,4 % (n = 17) feststellbar.

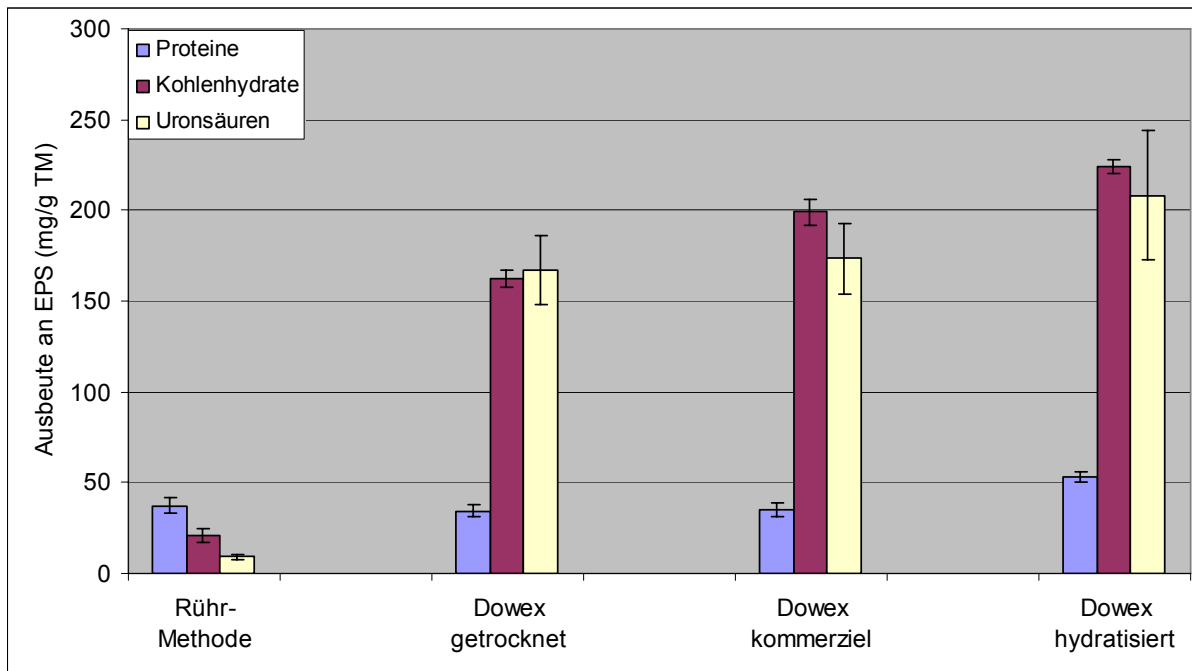
Die Kohlenhydrat- und Uronsäurebestimmungen wurden mit gereinigtem Alginat als Referenz durchgeführt.

Als Kationentauscher wurde das Kationentauscherharz Dowex 50 x 8 ausgewählt. In orientierenden Experimenten sollte überprüft werden, wie sich das Dowex in unterschiedlichen Endgehalten auf die Ausbeute an EPS von *P. aeruginosa* SG81 auf Ca-PIA auswirken würde. Dazu wurde die EPS-Isolierung mit der Dowex-Methode (wie in 3.2.2.3 beschrieben) mit unterschiedlichen Dowex-Gehalten durchgeführt.

In der Literatur (z. B.: Frølund et al. 1996) wurde für die EPS-Isolierung ein Gehalt von 70 g Dowex pro Gramm Glühverlust der Probe angegeben. Hierbei wurde aber nicht beschrieben, in welchem der 3 möglichen Zustände (kommerziell geliefert, vollständig getrocknet oder voll hydratisiert). Kommerziell geliefert, betrug der Feuchtigkeitsgehalt ca. 43 % (mittlerer Dowex-Gehalt, ca. 57 % Dowex). Es bestand die Möglichkeit, Dowex auch vollständig zu trocknen (höchster Dowex-Gehalt, 100 % Dowex) oder es vollständig zu hydratisieren (niedrigster Dowex-Gehalt, 39 % Dowex, Feuchtigkeitsgehalt ca. 61 %). Die Feuchtigkeitsgehalte wurden in einer Fünffachbestimmung experimentell überprüft.



In einem orientierenden Versuch wurden mögliche Einflüsse der 3 verschiedenen Zustände von Dowex auf die Ausbeute an EPS untersucht und mit der Rühr-Methode verglichen.



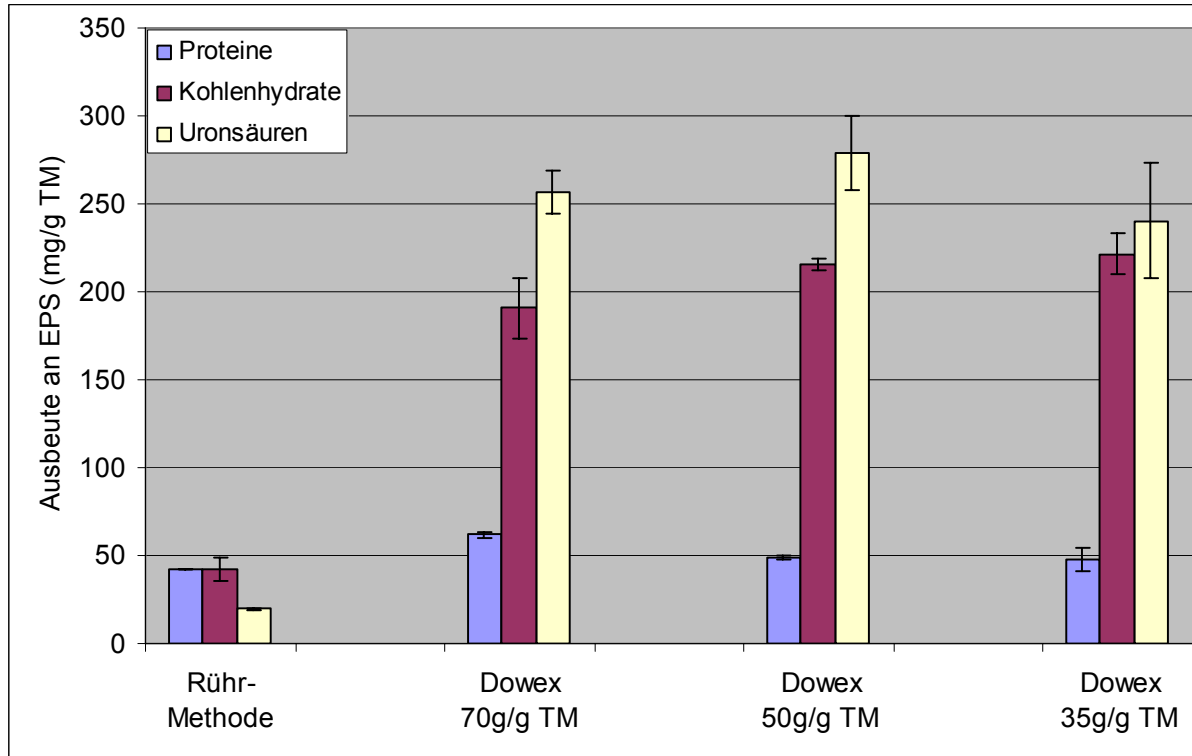
**Abb. 20:** EPS-Isolierung bei unterschiedlichen Dowex-Gehalten ( $n = 1$ ). Isoliert wurde die EPS von *P. aeruginosa* SG81 auf Ca-PIA. Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 36 °C. Es wurden die Summenparameter der Proteine, Kohlenhydrate und Uronsäuren bestimmt.

Wurden die Werte anhand der unterschiedlichen Dowex-Gehalte und in Bezug auf die Isolierung mit der Rühr-Methode verglichen (siehe Abb. 20) zeigte sich, dass der Wert der Gesamt-Proteine bei allen Ansätzen, bis auf den mit voll hydratisiertem Dowex, nahezu gleich war. Bei voll hydratisiertem Dowex (Dowex hydratisiert) war der Wert um ca. 40 % höher. Der Wert für die Gesamt-Kohlenhydrate stieg mit abnehmendem Dowex-Gehalt (s. o.) an. Bei dem niedrigsten Dowex-Gehalt (Dowex hydratisiert) lag der Wert für die Gesamt-Kohlenhydrate ca. 40 % höher als bei dem höchsten Dowex-Gehalt (Dowex getrocknet). In Bezug zu der Rühr-Methode war der Wert für die Gesamt-Kohlenhydrate, bei der Verwendung von Dowex, mindestens 8-mal höher. Bei den Uronsäurewerten zeigte sich eine vergleichbare Tendenz wie bei den Kohlenhydraten.

Dowex in getrocknetem Zustand sorbierte einen großen Teil der Flüssigkeit. Somit war eine unverfälschte EPS-Isolierung und Analyse nicht durchführbar.

Aus dieser Untersuchung ließ sich erkennen, dass für eine EPS-Isolierung voll hydratisiertes Dowex am geeignetsten war.

Um zu untersuchen, inwieweit sich niedrigere Gehalte an Dowex auf die Ausbeute an EPS, von *P. aeruginosa* SG81 auf Ca-PIA, auswirken würden, wurden in einem Versuch 3 verschiedene Konzentrationen (70, 50 und 35 Gramm voll hydratisiertes Dowex pro Gramm Trockenmasse) untersucht. Die Durchführung erfolgte mit der Dowex-Methode, wie in 3.2.2.3 beschrieben.



**Abb. 21:** EPS-Isolierung bei unterschiedlichen Dowex-Gehalten des voll hydratisierten Dowex ( $n = 1$ ). Isoliert wurden die EPS von *P. aeruginosa* SG81 auf Ca-PIA. Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 36 °C. Es wurden die Summenparameter der Proteine, Kohlenhydrate und Uronsäuren bestimmt.

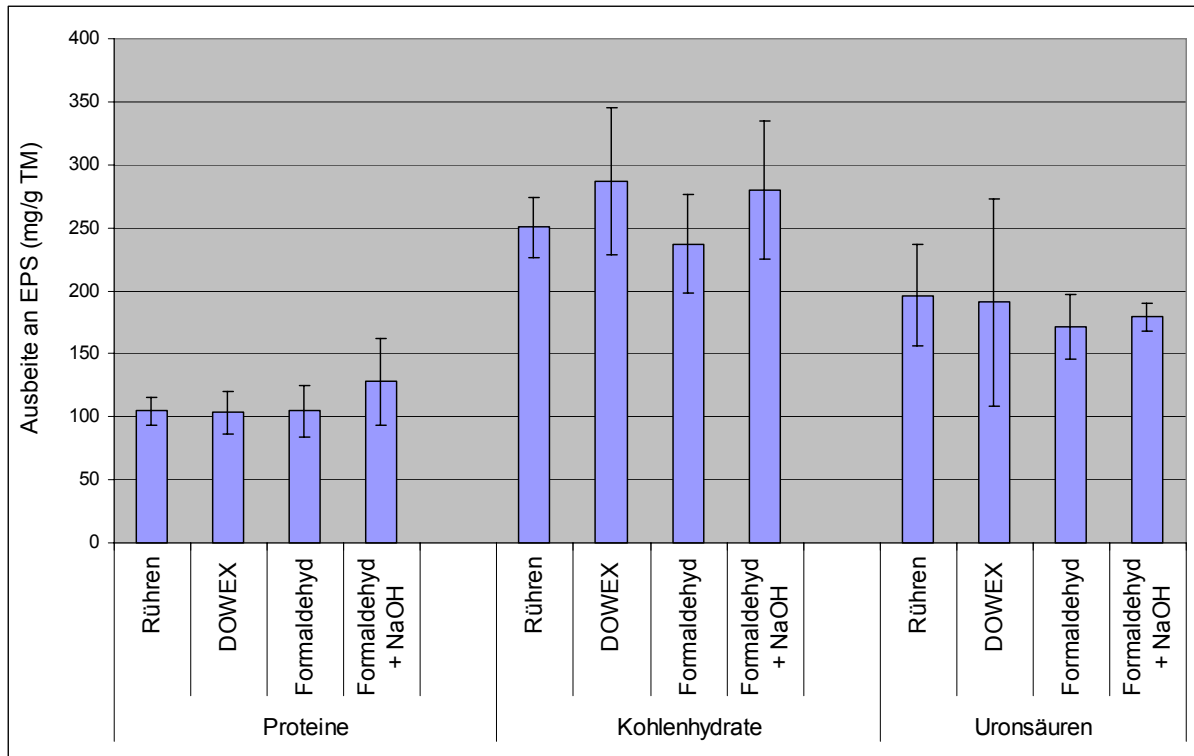
Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abb. 21 dargestellt. Dabei zeigte sich kein eindeutiger Unterschied in den Werten der Summenparameter bei den unterschiedlichen Dowex-Gehalten. In Bezug zu der Isolierung mit der Rühr-Methode waren die Werte der Kohlenhydrate und Uronsäuren, bei der Verwendung von Dowex, mindestens 6-mal höher. Dabei war ein eindeutiger Unterschied bei den Proteinen nicht erkennbar. Da nicht mehr Uronsäuren als Kohlenhydrate vorhanden sein können, sind die erhöhten Uronsäurewerte auf Messungenauigkeiten zurückzuführen.

Anhand dieser Untersuchungen war zu erkennen, dass bei einem Gehalt von 70 g Dowex in voll hydratisiertem Zustand pro g TM keine nachteiligen Effekte zu erwarten waren. Daher wurde Dowex mit 70 g/g TM in voll hydratisiertem Zustand für alle weiteren Versuche eingesetzt.

Um eine mögliche Zellschädigung (Freisetzung intrazellulärer Bestandteile) durch die EPS-Isolierungsmethoden zu untersuchen, wurde der DNA-Gehalt nach der EPS-Isolierung in den zellfreien Überständen vor der Dialyse untersucht. Die Zunahme an DNA in den EPS kann als ein Indikator für Zellschädigung verwendet werden (z. B.: Liu und Fang 2002). Bei den EPS-Isolierungen mit der Dowex-Methode zeigte sich, im Vergleich zu der Rühr-Methode ( $n = 4$ ), eine Zunahme des DNA-Gehaltes um bis zu dem 90 fachen Wert. Die Erhöhung des nachweisbaren DNA-Gehaltes könnte auf eine mögliche Zelllyse bei der Anwendung der Dowex-Methode hinweisen. Bei der EPS-Isolierung mit Formaldehyd mit und ohne NaOH konnte keine Erhöhung des DNA-Gehaltes nachgewiesen werden ( $n = 2$ ).

Als ein weiterer Indikator für Zellschädigung wurde auch die Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase gemessen (siehe 3.5.5). In der Literatur (z. B.: Ng und Dawes 1973, Mulligan et al. 1989) wurde beschrieben, dass Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in *P. aeruginosa* vorhanden sei. Diese liegt strikt intrazellulär vor (Wingender et al. 2001). Hierbei konnte in keiner Probe (zellfreier Überstand vor der Dialyse) Enzym-Aktivität nachgewiesen werden ( $n = 3$ ). Daraus ließ sich schließen, dass die messbare Zunahme an DNA bei der Dowex-Methode nicht zwingend auf Zellschädigung zurückzuführen war. Um zu überprüfen, inwieweit die Isolierungslösung die Überprüfung der Zellschädigung beeinflussen konnten, wurde kommerzielle DNA direkt in der Isolierungslösung (0,06 ml Formaldehyd (37 %) und 4 ml 1M NaOH pro 10 ml Lösung) der Formaldehyd-NaOH-Methode gelöst, dialysiert und dann gemessen. Hier waren nur noch 26 % der eingesetzten DNA-Konzentration nachweisbar, während sich in einem Kontrollansatz mit deionisiertem Wasser noch 92 % nachweisen ließen. Setzte man eine kommerzielle Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase der Isolierungslösung der Formaldehyd-Methode oder der Formaldehyd-NaOH-Methode aus, konnte keine Enzymaktivität mehr gemessen werden. Es stellte sich heraus, dass bei EPS-Isolierung mit der Formaldehyd-NaOH-Methode (pH-Wert der Isolierungslösung = 13,3) der Grad der Zellschädigung weder über die DNA-Bestimmung noch über die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenaseaktivität erfasst werden konnte.

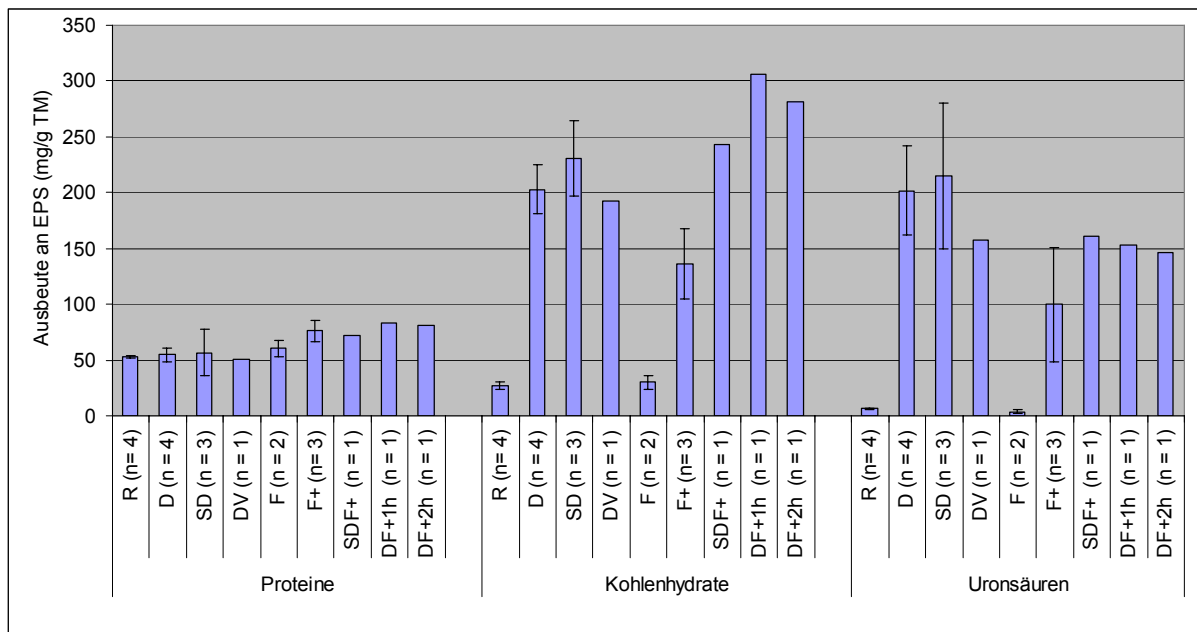
In 2 Experimenten sollte untersucht werden, inwieweit sich verschiedene EPS-Isolierungsmethoden auf Ausbeute und Zusammensetzung der EPS von *P. aeruginosa* SG81 auf PIA auswirken würden. Hierzu wurden 4 verschiedene Methoden (Rühr-Methode, Dowex-Methode, Formaldehyd mit und ohne NaOH) verwendet, um die EPS zu isolieren (siehe 3.2.2). Dowex und NaOH wurden häufig für EPS-Isolierungen bei Belebtschlammproben verwendet (siehe Tabelle 5 und 6).



**Abb. 22:** EPS-Isolierung mit 4 verschiedenen Isolierungsmethoden (n = 2). Es wurden die EPS von *P. aeruginosa* SG81, angewachsen auf PIA, isoliert. Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 36 °C. Es wurden die Summenparameter der Proteine, Kohlenhydrate und Uronsäuren bestimmt.

Wie in Abb. 22 erkennbar ist, war ein eindeutiger Unterschied in den Ausbeuten an EPS mit den verschiedenen Methoden nicht zu beobachten. Die Summenparameter und die Verhältnisse zueinander waren vergleichbar. Der Anteil der Uronsäuren an den Gesamtkohlenhydraten lag bei ca. 70 %. Es konnten ungefähr doppelt so hohe Werte an Kohlenhydraten wie an Proteinen gemessen werden.

Die Auswirkung von verschiedenen EPS-Isolierungsmethoden auf Ausbeute und Zusammensetzung der EPS von *P. aeruginosa* SG81 auf Ca-PIA sollte in mehreren Experimenten untersucht werden. Um den Einfluss von verschiedenen Kombinationen der EPS-Isolierungsverfahren und Dispergierungsverfahren zu untersuchen, wurden insgesamt 8 verschiedene Methoden (Rühr-Methode (R), Dowex-Methode (D), Stomacher mit Dowex (SD), Dowex miniaturisiert unter Verwendung eines Vortex (DV) Formaldehyd-Methode (F), Formaldehyd-NaOH-Methode (F+), Stomacher mit Dowex und Formaldehyd mit NaOH (SDF+) und Dowex und Formaldehyd mit NaOH (DF+)) verwendet, um die EPS zu isolieren (siehe 3.2.2).



**Abb. 23:** EPS-Isolierung mit 8 verschiedenen Isolierungsmethoden. Es wurden die EPS von *P. aeruginosa* SG81, angewachsen auf Ca-PIA, isoliert. Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 36 °C. Es wurden die Summenparameter der Proteine, Kohlenhydrate und Uronsäuren bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte oder die Werte von Einzelversuchen.

Anhand dieser Untersuchungen war, wie in Abb. 23 dargestellt, erkennbar, dass die EPS-Isolierung durch die Rühr-Methode oder mit der Formaldehyd-Methode, im Vergleich mit den anderen Methoden, niedrigere Werte lieferten. Bei den Methoden mit Dowex (D, SD, DV) konnten 8-mal höhere Werte für Kohlenhydrate und 25-mal höhere Werte für Uronsäuren als durch die Rühr-Methode (R) nachgewiesen werden. Ein Einfluss der Dispergierungsmethode (Propellerrührer bei (D), Stomacher oder Vortex) war nicht eindeutig erkennbar. Auch die Formaldehyd-NaOH-Methode (F+) lieferte höhere Werte für Kohlenhydrat (ca. 4-mal höher) und Uronsäure (ca. 10-mal höher) als die Rühr-Methode, aber nicht so hohe Werte wie die Methoden mit Dowex. Im Vergleich der Formaldehyd-NaOH-Methode mit den Methoden mit Dowex waren ca. 70 % der Kohlenhydratwerte und 50 % der Uronsäurewerte nachweisbar. Wurde die Dowex-Methode mit Formaldehyd und NaOH kombiniert (SDF+, DF+), konnten

höhere Werte (ca. 40 % mehr) bei den Kohlenhydraten erzielt werden als mit der Dowex-Methode.

Bei der Betrachtung der Verhältnisse der EPS-Komponenten zeigte sich, dass bei der EPS-Isolierung durch die Rühr-Methode oder mit der Formaldehyd-Methode der Anteil der Uronsäuren an den Gesamtkohlenhydraten bei ca. 10 % bis 20 % lag. Es konnte ungefähr eine doppelt so hohe Menge an Proteinen wie an Kohlenhydraten nachgewiesen werden. Bei den Methoden mit Dowex bestanden die Gesamtkohlenhydrate hauptsächlich aus Uronsäuren (ca. 90 %). Es wurden 3 bis 6-mal mehr Kohlenhydrate nachgewiesen als Proteine. Bei der Formaldehyd-NaOH-Methode lag der Anteil der Uronsäuren an den Gesamtkohlenhydraten zwischen 50 % und 100 %. Es konnten 1,5 bis 2-mal mehr Kohlenhydrate als Proteine nachgewiesen werden. Bei den Dowex-Formaldehyd-NaOH-Kombinationen lag der Anteil der Uronsäuren an den Gesamtkohlenhydraten zwischen 50 % und 70 %. Hierbei konnten ca. 3,5-mal mehr Kohlenhydrate, in Bezug auf die Proteine, nachgewiesen werden.

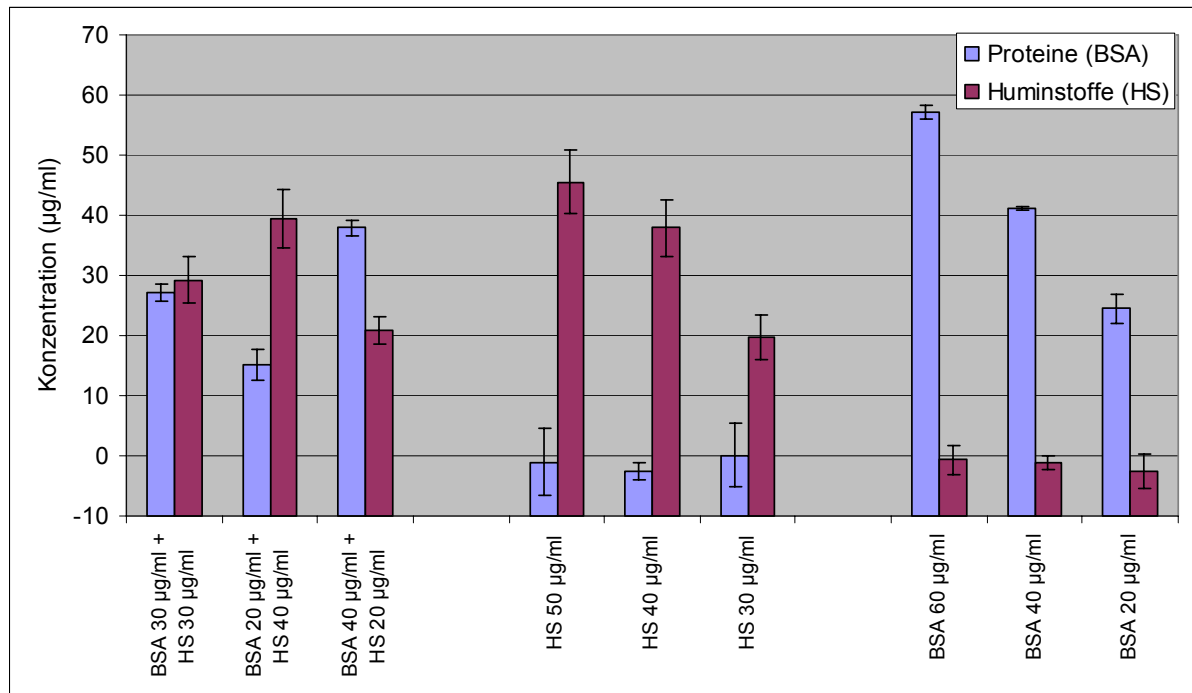
Die Methoden mit dem Kationentauscher Dowex erzielten die höchsten Ausbeuten im Vergleich der EPS-Isolierungsmethoden. Nur in Kombination des Dowex mit Formaldehyd und NaOH waren noch höhere Werte zu erzielen.

Aus den Versuchsreihen ließ sich schließen, dass der Kationentauscher Dowex in voll hydratisiertem Zustand und mit 70 g Dowex pro Gramm Trockenmasse einzusetzen war. Einen Effekt der verschiedenen Methoden war nur bei den EPS-Isolierungen von Ca-PIA zu erkennen. Hier zeigten sich bei der Verwendung des Dowex die höchsten Ausbeuten bei Kohlenhydraten und Uronsäuren. Die Ausbeute an Proteinen war bei allen Methoden ähnlich. Die Dowex-Methode zeigte keinen eindeutigen Hinweis auf Zellschädigung, während bei der Verwendung von Formaldehyd und NaOH keine Aussage getroffen werden konnte. Auch war bei der Formaldehyd-NaOH-Methode eine chemische Veränderung von EPS-Komponenten nicht auszuschließen. Die Formaldehyd-Methode lieferte in den bisherigen Untersuchungen keine höhere Ausbeute an EPS als die Rühr-Methode. Aus diesem Grund wurde die Formaldehyd-Methode nicht weiter untersucht, da mit dieser Methode keine Steigerung der Ausbeute an EPS erwartet wurde.

#### **4.1.2 EPS-Isolierung aus Umweltproben**

Die EPS-Isolierung sollte an möglichst unterschiedlichen Proben durchgeführt werden, um einen Eindruck von der Leistungsfähigkeit der Methoden zu erhalten. Bei EPS von *P. aeruginosa*, die überwiegend über Kationen verbrückt waren, konnte der Kationentauscher Dowex hohe Ausbeuten aufweisen. Anhand von Proben mit unterschiedlichen Möglichkeiten der Kohäsion sollten die Methoden nun weiter untersucht werden. Dazu wurden Biofilmpuben von Lysimeter-Schmutzdecken, Fließgewässern und aus der Papierindustrie verwendet.

In Umweltproben war mit Huminstoffen zu rechnen. Diese konnten die Proteinbestimmung nach Lowry erheblich beeinflussen. Nach Frølund et al. (1995) ließen sich beide Komponenten zusammen mittels einer modifizierten Lowry-Methode bestimmen und differenzieren. Dazu wurde die Probe mit und ohne Kupferzugabe gemessen (siehe 3.2.3.2.2 und 3.2.3.3) und anschließend die Messwerte miteinander verrechnet. Dies wurde in 4 Versuche überprüft.



**Abb. 24:** Bestimmung des Huminstoff- und Protein-Gehaltes anhand der Referenzsubstanzen. Angegeben sind die Mittelwerte für Protein-Huminstoff-Mischungen ( $n = 4$ ) sowie Huminstoffe (HS) und Proteine (BSA) ( $n = 3$ ).

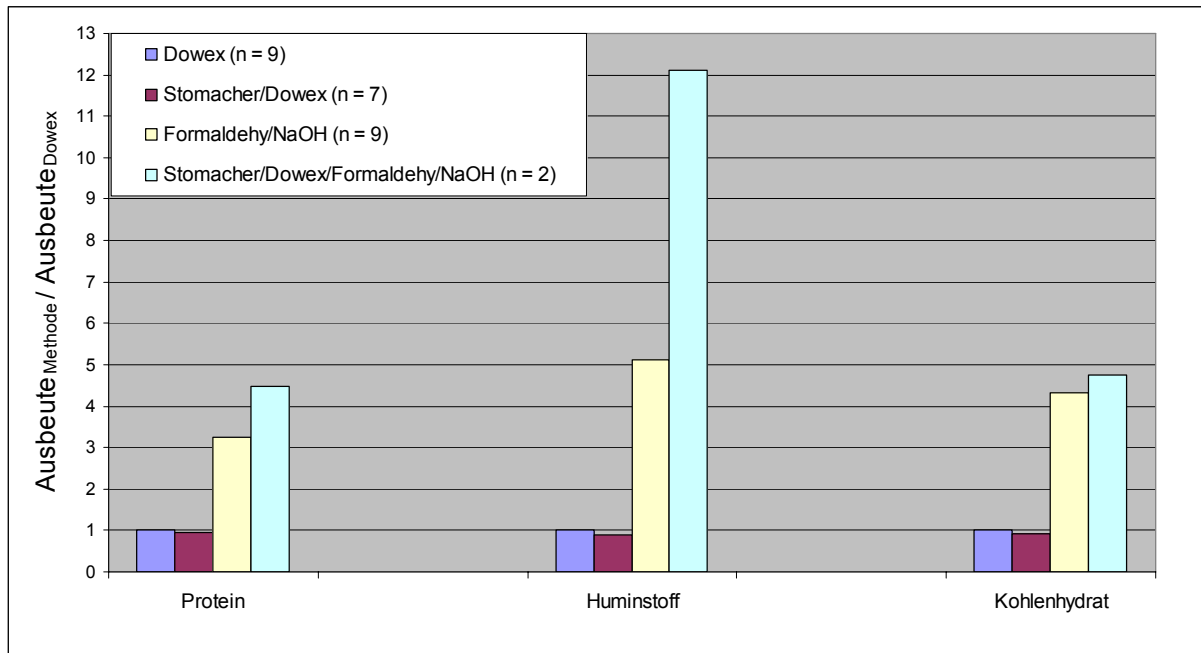
Aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchung (siehe Abb. 24) konnte davon ausgegangen werden, dass zumindest mit den Referenzsubstanzen, die Differenzierung von Proteinen und Huminstoffen möglich war, da die Messwerte der Referenzsubstanzen und deren Mischungen im Bereich der theoretischen Werte lagen.

#### 4.1.2.1 Lysimeter-Schmutzdecken

Lysimeter-Schmutzdecken sind sehr heterogene, biologisch aktive Schichten auf Wasserfiltern (z. B.: Petry-Hansen et al. 2006). Anhand dieser Proben war es möglich, Biofilme aus technischen Systemen der Wasserbehandlung in die Untersuchung mit einzubeziehen. Die Proben stammten von unterschiedlichen Lysimetern und Langsandsandfiltern von verschiedenen Probenahmestellen.

An 9 unterschiedlichen Lysimeter-Schmutzdecken wurden insgesamt 4 verschiedene EPS-Isolierungsmethoden untersucht. Dabei handelte es sich um die Dowex-Methode, die Methode mit Stomacher und Dowex, die Formaldehyd-NaOH-Methode

und eine Kombination aus Stomacher, Dowex und Formaldehyd mit NaOH (siehe 3.2.2).



**Abb. 25:** Isolierung von EPS aus Lysimeter-Schutzdecken. Es wurden die Summenparameter von Proteinen, Huminstoffen und Kohlenhydraten von 4 verschiedenen Isolierungsmethoden bestimmt. Die Werte wurden relativ zu der Dowex-Methode angegeben, wobei diese als 1 gesetzt wurde.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden in Abb. 25 dargestellt. Dabei war festzustellen, dass die beiden Methoden, in denen nur Dowex verwendet wurde (Dowex, Stomacher/Dowex), ähnliche Ergebnisse lieferten. Mit der Formaldehyd-NaOH-Methode zeigten sich ca. 2 bis 5-mal höhere Werte in allen 3 Parametern als mit der Dowex-Methode. Insbesondere vor der Dialyse waren hier die Kohlenhydrat-Werte teils 10-mal höher als noch nach der Dialyse (Daten nicht gezeigt). Bei der Kombination von Dowex mit Formaldehyd und NaOH konnten bis zu 12-mal höhere Werte für Huminstoffe festgestellt werden als mit den beiden Methoden mit Dowex. Die Werte für Proteine und Kohlenhydrate waren dabei vergleichbar mit denen der Formaldehyd-NaOH-Methode.

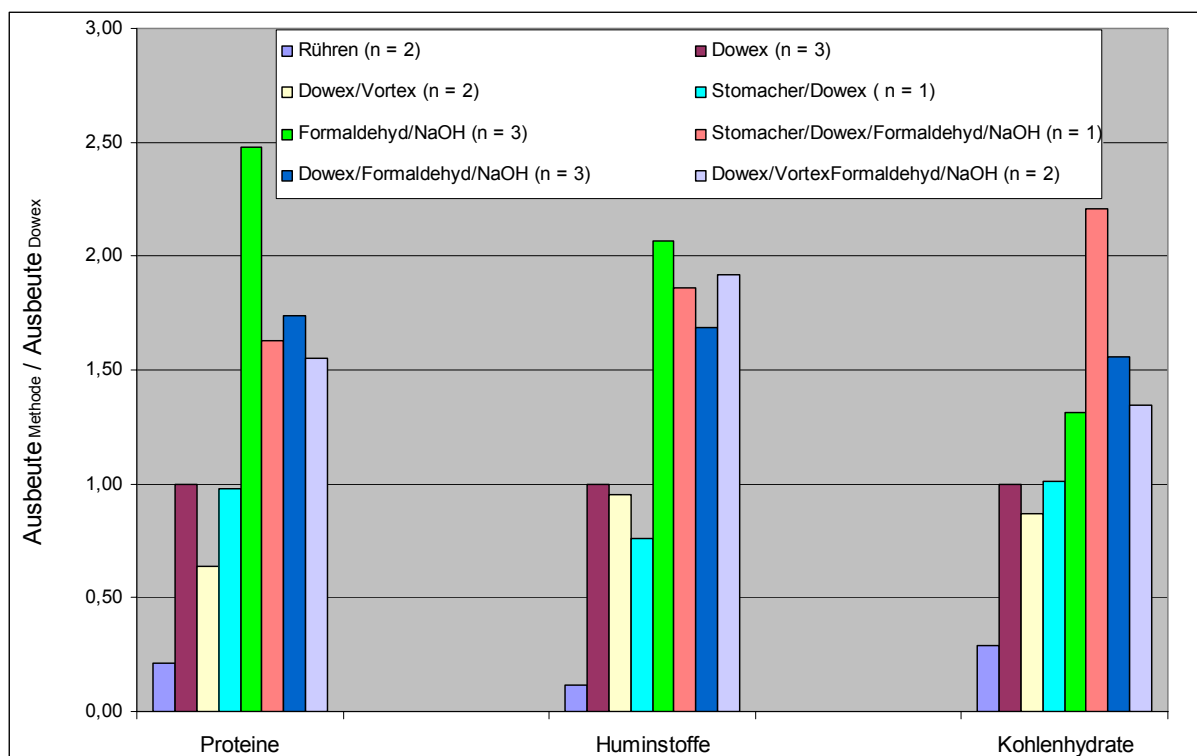
In 7 von 9 Proben waren die Verhältnisse von Proteinen zu Huminstoffen und zu Kohlenhydrat ähnlich und unabhängig von der Methode. Es konnten ungefähr 2-mal mehr Proteine im Vergleich zu den Kohlenhydraten und 3-mal mehr Proteine im Vergleich zu den Huminstoffen nachgewiesen werden. In 2 Proben zeigten sich Unterschiede. Hier lagen bei der Formaldehyd-NaOH-Methode die Werte für Huminstoff und Kohlenhydrat vergleichsweise hoch, da alle 3 Werte in ähnlicher Größenordnung aufzufinden waren.



#### 4.1.2.2 Fließgewässerbiofilme

Fließgewässerbiofilme wurden aufgrund ihrer heterogenen Zusammensetzung untersucht. Hierzu wurden epilithische Biofilme verwendet, die aus dem Fluss Ruhr bei Mülheim entnommen wurden. Mit diesen Proben war es möglich, Biofilme aus natürlichen aquatischen Systemen bei der Bewertung der EPS-Isolierungsmethoden zu berücksichtigen.

Bei 3 Biofilmpuben wurden insgesamt 8 verschiedene Isolierungsmethoden angewendet. Dabei handelte es sich um die Rühr-Methode, die Dowex-Methode, Dowex miniaturisiert unter Verwendung eines Vortex, Stomacher mit Dowex, die Formaldehyd-NaOH-Methode, Stomacher mit Dowex mit Formaldehyd und NaOH, Dowex und Formaldehyd mit NaOH (DF+) sowie Dowex und Formaldehyd mit NaOH miniaturisiert unter Verwendung eines Vortex (siehe 3.2.2).



**Abb. 26:** EPS-Isolierung von epilithischen Biofilmen der Ruhr. Es wurden die Summenparameter von Proteinen, Huminstoffen und Kohlenhydraten bei 8 verschiedenen Isolierungsmethoden bestimmt. Die Werte wurden relativ zu der Dowex-Methode angegeben, wobei diese als 1 gesetzt wurde.

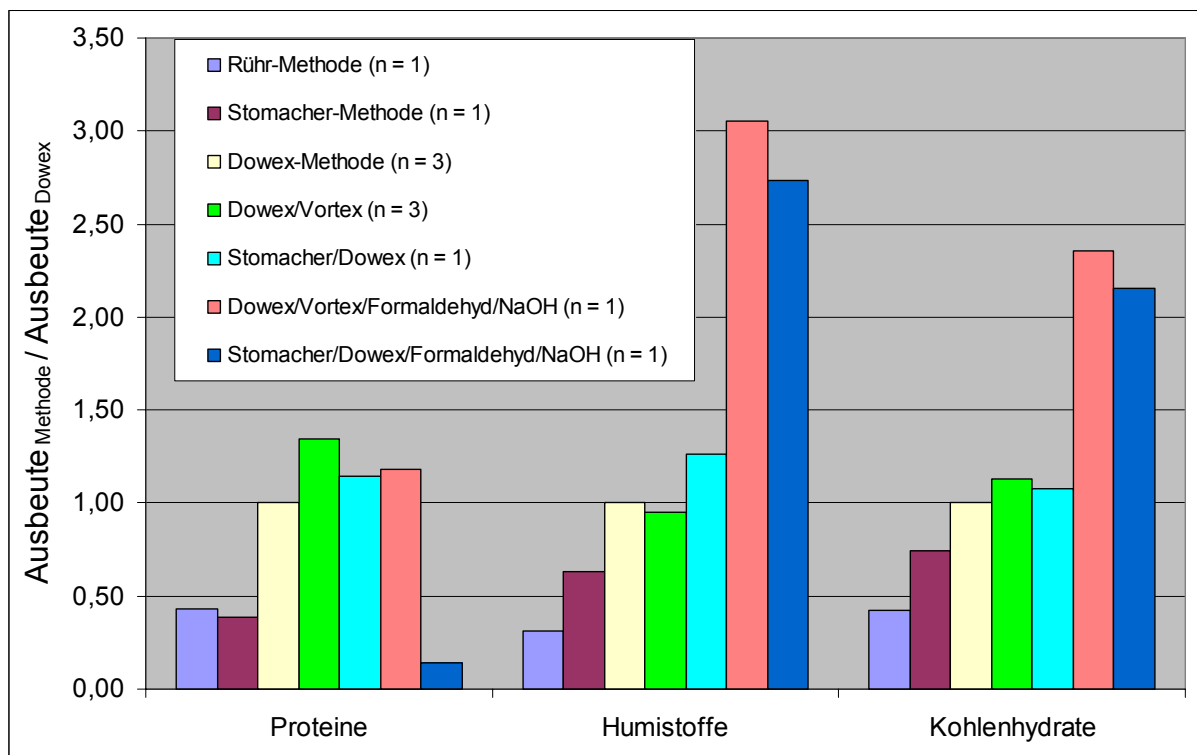
Wie aus Abb. 26 zu entnehmen ist, lieferten alle Isolierungsmethoden bei allen 3 Parametern mindestens 3-mal höhere Ausbeuten als die EPS-Isolierung mit der Rühr-Methode. Bei den 3 Isolierungen nur mit Dowex (Dowex-Methode, Dowex/Vortex und Stomacher/Dowex) wurden mit diesen 3 Methoden ähnliche Ergebnisse erzielt, sodass weder ein Einfluss der Dispergierungsmethode (Propellerrührer bei der Dowex-Methode, Vortex oder Stomacher) noch ein

eindeutiger Einfluss der Zeit (Dowex-Methode 2 h, Dowex/Vortex 20 min, Stomacher/Dowex 15 min) erkennbar war. Die Methoden mit Formaldehyd und NaOH lieferten ca. doppelt so hohe Ausbeuten im Vergleich zu den Methoden mit Dowex. Ein eindeutiger Trend in den Verhältnissen der Summenparameter zueinander war nicht erkennbar. Tendenziell waren aber mehr Proteine als Huminstoffe nachweisbar. Proteine und Kohlenhydrate wurden in ähnlichen Mengen gefunden.

#### 4.1.2.3 Biofilme aus der Papierherstellung

Es wurden Biofilme aus der Papierherstellung untersucht. Bei diesen Proben handelte es sich um Biofilme, die in sehr nährstoffreicher Umgebung existierten. Durch diese Biofilme konnten Proben aus der Industrie für die Bewertung der EPS-Isolierungsmethoden verwendet werden.

Anhand von 3 Proben und insgesamt 7 verschiedenen Methoden (Rühr-Methode, Stomacher-Methode, Dowex-Methode, Dowex miniaturisiert unter Verwendung eines Vortex, Stomacher und Dowex, Dowex und Formaldehyd mit NaOH miniaturisiert unter Verwendung eines Vortex und ebenfalls Stomacher und Dowex mit Formaldehyd und NaOH) wurde die EPS-Isolierung untersucht (siehe 3.2.2).



**Abb. 27:** Isolierung von EPS von Biofilmen aus der Papierherstellung. Es wurden die Summenparameter von Proteinen, Huminstoffen und Kohlenhydraten bei 7 verschiedenen Isolierungsmethoden bestimmt. Die Werte wurden relativ zu der Dowex-Methode angegeben, wobei diese als 1 gesetzt wurde.

Anhand der Ergebnisse, die in Abb. 27 dargestellt sind, ließ sich Folgendes erkennen. Die Rühr-Methode und die Stomacher-Methode lieferten die geringsten Ausbeuten. Hier konnte ein Einfluss der Intensität der Scherkräfte bei der Isolierung von Huminstoffen und Kohlenhydraten nicht ausgeschlossen werden, da die Stomacher-Methode hier eine ca. doppelt so hohe Ausbeute lieferte.

Die 3 Methoden nur mit Dowex (Dowex-Methode, Dowex/Vortex und Stomacher/Dowex) lieferten untereinander ähnliche Resultate. Hierbei war erkennbar, dass mit diesen Methoden, bei allen 3 Parametern, nahezu doppelt so hohe Ausbeuten erzielt werden konnten als mit der Rühr-Methode. Wurde Dowex in Kombination mit Formaldehyd und NaOH eingesetzt, ließen sich deutlich mehr Huminstoffe und Kohlenhydrate auffinden. Im Vergleich zu der Dowex-Methode konnten ungefähr 3-mal mehr Huminstoffe und doppelt so viele Kohlenhydrate nachgewiesen werden.

Aus den Untersuchungen der EPS-Isolierungsmethoden ließ sich der Schluss ziehen, dass bei Umweltproben mit Formaldehyd und NaOH eine höhere Ausbeute an EPS (hauptsächlich Huminstoffe und Kohlenhydrate) zu erzielen war als nur durch den Einsatz von Dowex. Der Kationentauscher Dowex konnte im Vergleich zu der EPS-Isolierung mit der Rühr-Methode höhere Ausbeuten aufweisen. Das miniaturisierte Dowex-Verfahren wies häufig vergleichbare Ausbeuten wie die Isolierung mit der Dowex-Methode auf. Eine Zellschädigung durch die Isolierung mit Dowex konnte nicht nachgewiesen werden.

#### **4.1.3 Isolierung von EPS aus Trinkwasserbiofilmen**

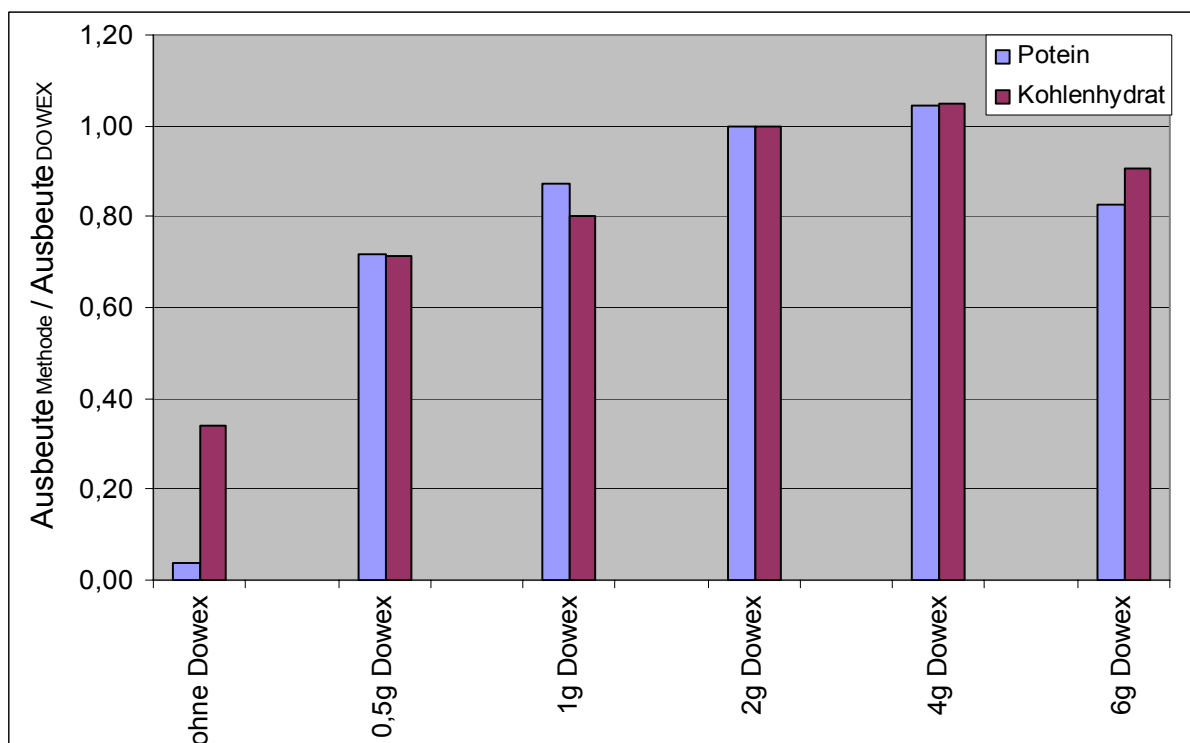
Anhand der gewonnenen Erkenntnisse sollten die EPS aus Trinkwasserbiofilmen isoliert werden. Bei Trinkwasserbiofilmen handelte es sich um Proben, die nur geringe Mengen an Probenmaterial aufwiesen. Für die Isolierung wurde deshalb das zuvor entwickelte miniaturisierte Dowex-Verfahren (Dowex miniaturisiert unter Verwendung eines Vortex (DV), siehe 3.2.2.3) angewendet. Hiermit konnte eine EPS-Isolierung mit einem Probenvolumen von 5 ml bis 25 ml durchgeführt werden.

Da aufgrund von geringen Probenmengen auch geringe Konzentrationen an EPS-Komponenten zu erwarten waren, wurde versucht, die Empfindlichkeit des Proteinnachweises zu verbessern (mit der modifizierten Lowry-Methode lassen sich Proteine im Mikrogramm-Bereich quantifizieren). Hierzu sollte ein sensitiverer fluorometrischer Test etabliert werden. Mit dem NanoOrange® Protein Quantitation Kit (siehe 3.2.3.2.1) sollten Proteine fluorometrisch im Nanogramm-Bereich quantifiziert werden können. Mehrfache Versuche (n = 4) zeigten, dass es im Bereich unter 1 µg/ml Proteinstandard nicht möglich war, das Messgerät zu kalibrieren. Es wurden verschiedene Verdünnungswässer (autoklaviertes deionisiertes Wasser, Reinstwasser, Wasser für die Molekularbiologie, endotoxinfreies Wasser) getestet, aber es konnte kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden. Es war nicht

möglich, einen stabilen 0-Wert zu erhalten. Unter diesen Umständen war es nicht sinnvoll die Proteinquantifizierung mit dieser Methode durchzuführen.

Um eine Bezugsgröße für die EPS-Analytik zu erhalten, wurde trotz der geringen Probenmenge versucht, die Trockenmasse eines Trinkwasserbiofilms, nach Anzucht über 14 Tage auf einem EPDM-Coupon, zu bestimmen. Hierbei zeigte sich, dass dies kaum möglich war. Bei einer Standard-Probennahme (ca. 15 cm<sup>2</sup> Biofilm in 10 ml deionisiertem Wasser) lag die Trockenmasse von 1 ml Probe im Milligramm-Bereich. Bei so geringen Mengen konnte keine sichere Aussage über die Trockenmasse nach DIN EN 12880 getroffen werden.

Wie aus den Experimenten der EPS-Isolierung zu erkennen war, eignete sich Dowex zu Erhöhung der Ausbeute an EPS im Vergleich zu der Rühr-Methode. Es sollte jetzt untersucht werden, ob sich Dowex auch für die EPS-Isolierung aus Trinkwasserbiofilmen eignete. Dazu wurden Experimente mit unterschiedlichen Dowex-Gehalten (0,5 g, 1 g, 2 g, 4 g, und 6 g pro 10 ml Biofilmsuspension) durchgeführt, da die Bezugsgröße der Trockenmasse nicht nutzbar war. Es wurde eine Zeit von 20 min für die Isolierung angesetzt. Das 20-min-Zeitintervall für die EPS-Isolierung schien aufgrund der vorherigen Versuche geeignet zu sein. Es hatte sich schon gezeigt, dass mit der Methode Dowex miniaturisiert unter Verwendung eines Vortex (DV siehe 3.2.2.3) in Bezug auf die Rühr-Methode (siehe 3.2.2.1) höhere Ausbeuten an EPS erzielt werden konnten.



**Abb. 28:** Isolierung von EPS aus 14 Tage alten Trinkwasserbiofilmen auf EPDM. Es wurden die Summenparameter von Proteinen, Huminstoffen und Kohlenhydraten bei verschiedenen Dowex-Gehalten bestimmt. Die Werte wurden relativ zu der Isolierung mit 2 g Dowex angegeben, wobei diese als 1 gesetzt wurde.

Durch Verwendung des Dowex-Kationentauschers wurde eine höhere Ausbeute (ca. verdreifacht) erzielt (siehe Abb. 28) als nur durch Dispergierung mit einem Vortex (ohne Dowex). Hierbei konnten die Parameter Proteine (ca.  $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) und Kohlenhydrate (ca.  $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) bestimmt werden. Bei den Isolierungen nur mit einem Vortex waren diese Parameter nicht sicher nachweisbar, da sie im Bereich der Nachweisgrenze lagen. 2 g Dowex pro 10 ml Biofilmprobe waren geeignet, um höhere Mengen an EPS zu isolieren. Bei 6 g Dowex war eine Abnahme der Ausbeute zu erkennen. Daher wurde die geringere Dowex-Menge (2 g pro 10 ml Probe) als am besten geeignet betrachtet.

Diese Experimente zeigten, dass es mit dem Dowex-Kationentauscher möglich war, höhere Ausbeuten an EPS aus Trinkwasserbiofilmen zu erhalten als nur durch Dispergieren. Die Ausbeuten an EPS, die mit dem Dowex erzielt werden konnten, erlaubten eine sichere Bestimmung der extrazellulären Proteine und Kohlenhydrate mit den photometrischen Assays (siehe 3.2.3).

## 4.2 Einnistungsexperimente

Es ist bekannt, dass sich durch Bakterien in Trinkwassersystemen auf allen Oberflächen Biofilme bilden können (z. B.: Berry et al. 2006). Es sollte nun untersucht werden, ob und inwieweit sich unterschiedliche *P. aeruginosa*-Stämme (2 mucoide, 4 nicht-mucoide und 2 Lektin-Defekt-Mutanten), mit verschiedenen Möglichkeiten EPS zu produzieren, in Trinkwasserbiofilme einnisten und dort persistieren konnten. Dazu wurden Trinkwasserbiofilme auf EPDM über 14 Tage angezüchtet. EPDM wird in Trinkwassersystemen auf weichdichtenden Absperrschiebern eingesetzt. Es war bekannt, dass dieser Werkstoff die Bildung von Biofilmen fördern kann (Kilb et al. 2003).

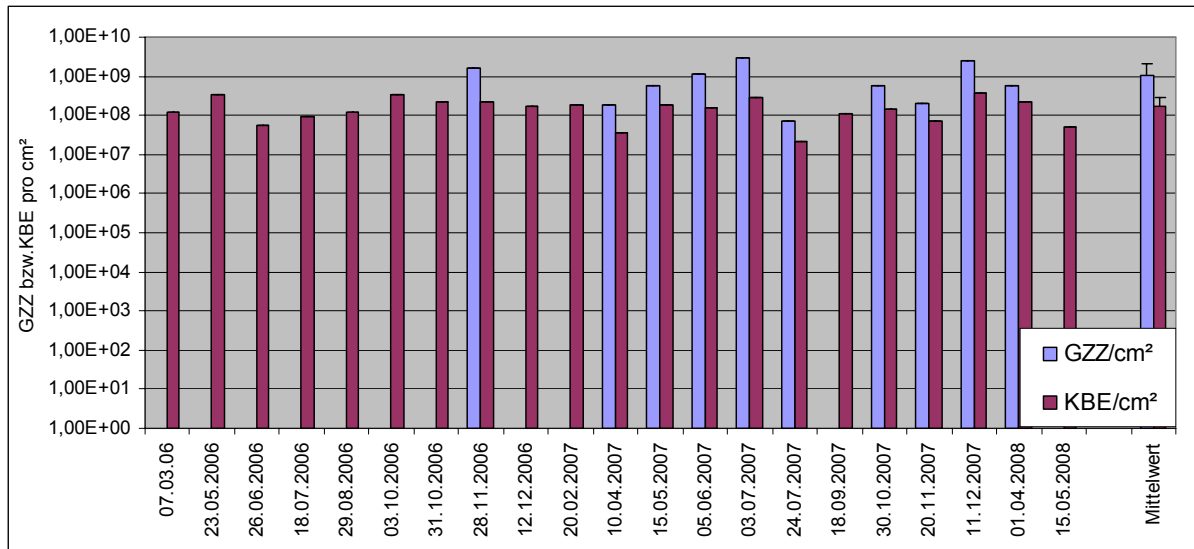
### 4.2.1 Charakterisierung des Trinkwassers

Das Trinkwasser aus der Hausinstallation der Universität Duisburg-Essen (im Labor U123) wurde für die Einnistungsexperimente verwendet. Mit diesem Trinkwasser wurden die Biofilme auf EPDM für die Experimente angezüchtet. Es wurden verschiedene Parameter sporadisch über den gesamten Zeitraum der Untersuchungen bestimmt. Das Trinkwasser im Labor (U123) hatte eine Temperatur von  $11^\circ\text{C}$  bis  $19^\circ\text{C}$ , einen Gehalt an freiem Chlor von  $<0,01$  bis  $0,02 \text{ mg/l}$ , einen pH-Wert von 7,1 bis 7,3 und einen Kupfergehalt von ca.  $80 \mu\text{g/l}$ . Der Kupfergehalt wurde 4-mal bestimmt ( $77 \mu\text{g/l}$  am 22.05.02,  $79 \mu\text{g/l}$  am 12.08.02,  $73 \mu\text{g/l}$  am 28.11.07 und  $88 \mu\text{g/l}$  am 03.06.08) (Bressler in prep.).

*P. aeruginosa* konnte in keinem der Experimente ( $n = 21$ ) in dem Trinkwasser der Hausinstallation (Labor U123) nachgewiesen werden.

#### 4.2.2 Charakterisierung der Biofilme nach 14 Tagen Anzucht

Für die Einnistungsexperimente wurden Biofilme auf EPDM über 14 Tage im Trinkwasserdurchfluss (50 ml/min) angezüchtet (siehe 3.3.2). Der Trinkwasserbiofilm nach 14 Tagen Anzucht im Kleinreaktor wies eine Gesamtzellzahl zwischen  $7 \times 10^7$  und  $3 \times 10^9$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  auf. Die Koloniezahl auf R2A-Medium variierte zwischen  $2 \times 10^7$  und  $4 \times 10^8$  KBE/ $\text{cm}^2$ , wobei 10 % bis 30 % aller Zellen anhand der Koloniezahl nachgewiesen werden konnten. Im Mittel lag die Gesamtzellzahl ( $n = 10$ ) bei  $1 \times 10^9$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  und die Koloniezahl ( $n = 21$ ) bei  $2 \times 10^8$  KBE/ $\text{cm}^2$ .

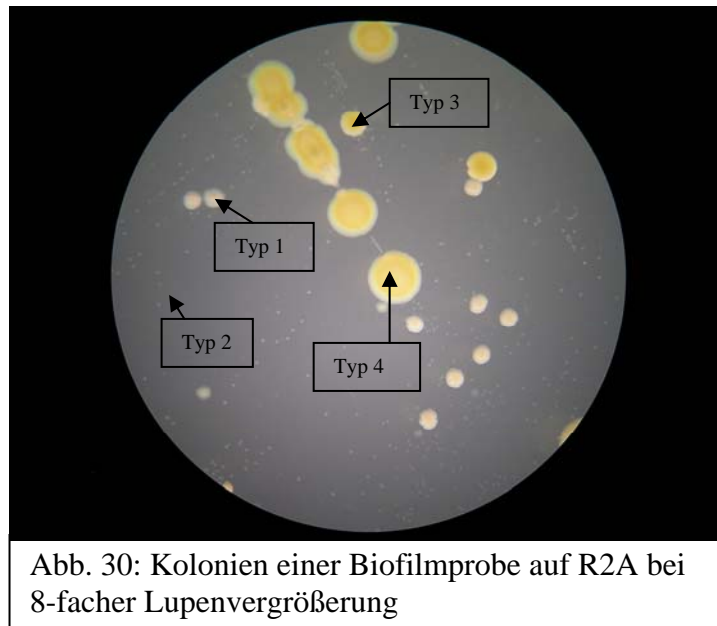


**Abb. 29:** Zeitliche Abfolge der Biofilm-Versuche. Aufgetragen wurde die Gesamtzellzahl (GZZ/ $\text{cm}^2$ ) und die dazu gehörende Koloniezahl (KBE/ $\text{cm}^2$ , bestimmt auf R2A bei 20 °C nach 7 Tagen).

Eine Tendenz der Biofilmparameter Gesamtzellzahl und/oder Koloniezahl auf R2A im Jahresverlauf ließ sich nicht erkennen (siehe Abb. 29).

*P. aeruginosa* konnte in keinem der Trinkwasserbiofilme vor der Beimpfung ( $n = 21$ ) nachgewiesen werden.

Während der HPC-Auswertung konnte beobachtet werden, dass hauptsächlich 3 bis 4 verschiedene Kolonietypen auf den R2A-Platten erkennbar waren (siehe Abb. 30).



Typ 1 klein ( $\varnothing = 1 - 3 \text{ mm}$ ), rund, glänzend, konvex, glatt, beige

Typ 2 sehr klein ( $\varnothing < 1 \text{ mm}$ ), rund, glatt, farblos, konvex

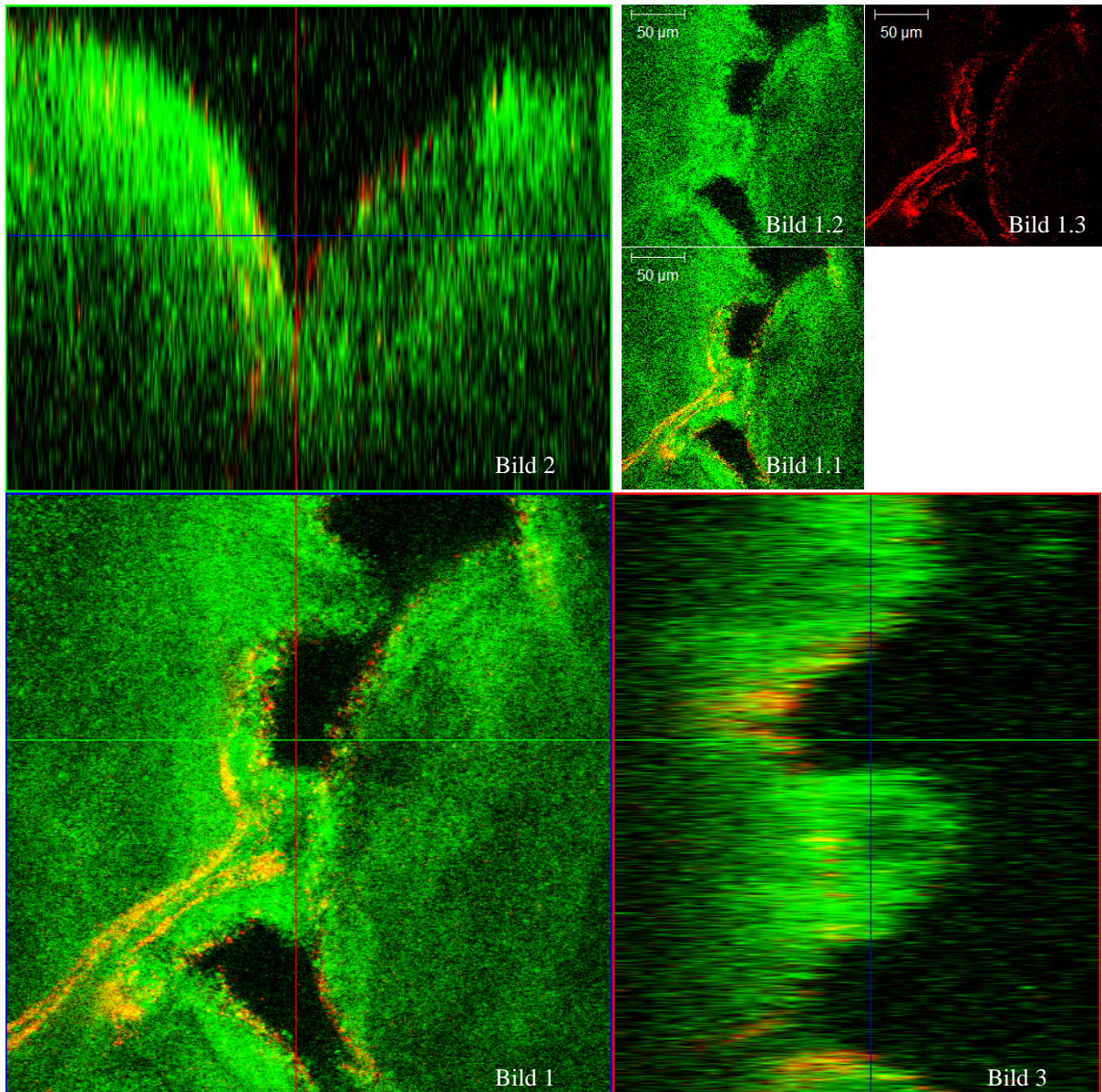
Typ 3 mittelgroß ( $\varnothing = 3 - 5 \text{ mm}$ ), rundlich, konvex, gelb-beige, glatt

Typ 4 groß ( $\varnothing > 5 \text{ mm}$ ), gelb-beige, glatt, rund

Beobachtungen über den gesamten Bearbeitungszeitraum zeigten, dass ca. 80 % – 90 % der Kolonien vom Typ 2 waren. Typ 1, 3 und 4 kamen meist in ähnlichen Verhältnissen vor. Erst bei mehr als 1000 KBE pro Platte konnten weitere Kolonietypen beobachtet werden.



Untersuchungen an den Biofilmen mittels der Live/Dead-Färbung (siehe 3.3.4.1) zeigten eine heterogene Verteilung der Mikroorganismen innerhalb des Biofilms. Der Anteil an Propidiumiodid gefärbten Zellen (membrangeschädigt) war deutlich geringer als der, der nur SYTO 9 (alle Zellen) gefärbten (siehe Abb. 31). Ein hoher Anteil an vitalen Zellen (10 % - 30 %) war auch bei der Bestimmung der Koloniezahl im Vergleich zu der Gesamtzellzahl (s. o.) erkennbar.



**Abb. 31:** Untersuchung eines 14 Tage alten Biofilms aus Trinkwasserbakterien auf EPDM mittels des CLSM. Darstellung bei 400-facher Vergrößerung. Bild 1 bzw. 1.1. zeigen einen optischen Schnitt in der x-y-Ebene (Aufsicht). Bild 1.2 stellt nur die SYTO 9-Färbung (grün, alle Zellen) und Bild 1.3 nur die Propidiumiodid-Färbung (rot oder gelb, membrangeschädigt) innerhalb von Bild 1.1 da. Bild 1 bzw. 1.1 ist das resultierende Bild aus der Überlagerung von Bild 1.2 und 1.3. Bild 2 stellt den Schnitt in der x-z-Ebene (Seitenansicht) entlang der grünen Linie, Bild 3 den Schnitt in der y-z-Ebene (Seitenansicht) entlang der roten Linie da. Die blaue Linie markiert die Position von Bild 1 im Bildstapel.

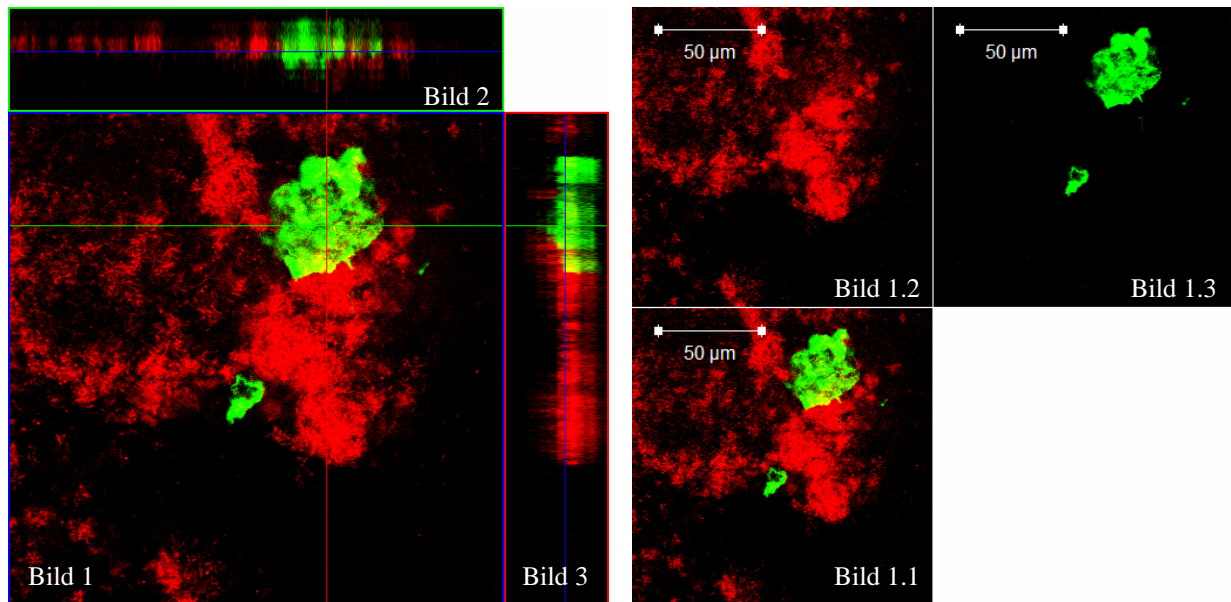


Versuche der Quantifizierung von vitalen und membrangeschädigten Zellen durch die Färbung von Biofilmsuspensionen mit dem Live/Dead-Kit und anschließender Filtration auf 0,2 µm Polycarbonatmembranen waren nicht erfolgreich. Bei dieser Untersuchung lag der Anteil an Propidiumiodid-gefärbten Zellen (membrangeschädigt) bei ca. 90 %. Daraus konnte geschlossen werden, dass mindestens dieser Prozentsatz (ca. 90 %) nicht mehr über Kultivierungsverfahren nachweisbar sein sollte. Da aber, wie oben erwähnt, der Anteil an kultivierbaren Bakterien bei ca. 10 % - 30 % lag, waren 90 % Propidiumiodid-gefärbte (membrangeschädigte) Zellen eher unwahrscheinlich.

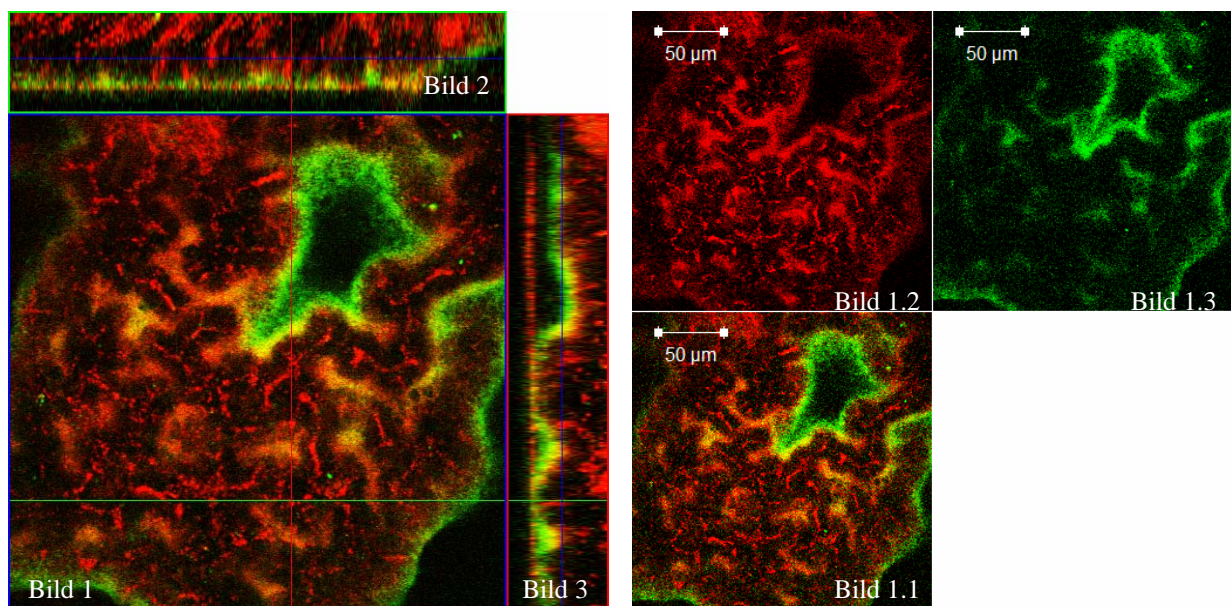
Um einen Eindruck über die Verteilung von Kohlenhydraten in der EPS der Trinkwasserbiofilme zu bekommen, wurden Untersuchungen mit fluoreszenzmarkierten Lektinen durchgeführt. Lektine sind Proteine, die an Kohlenhydrate binden können. Somit lassen sich bestimmte Bereiche in Biofilmen markieren (z. B.: Strathmann 2003). Untersuchungen an Trinkwasserbiofilmen mit fluoreszenzmarkierten Lektinen zeigten, dass es dort Bereiche gab, an denen sich die Lektine anlagerten. Beispielhaft wurde dies in Abb. 32 für das Lektin LecB, in Abb. 33 für das Lektin WGA und in Abb. 34 für das Lektin ConA dargestellt.

Das Lektin LecB bindet an p-nitrophenyl- $\alpha$ -L-Fucose oder L-Fucose (Gilboa-Garber et al. 2000), ConA an  $\alpha$ -Mannose oder  $\alpha$ -Glucose und WGA an N-Acetylglucosamin oder N-Acetylneuraminat (Goldstein und Hayes, 1978).

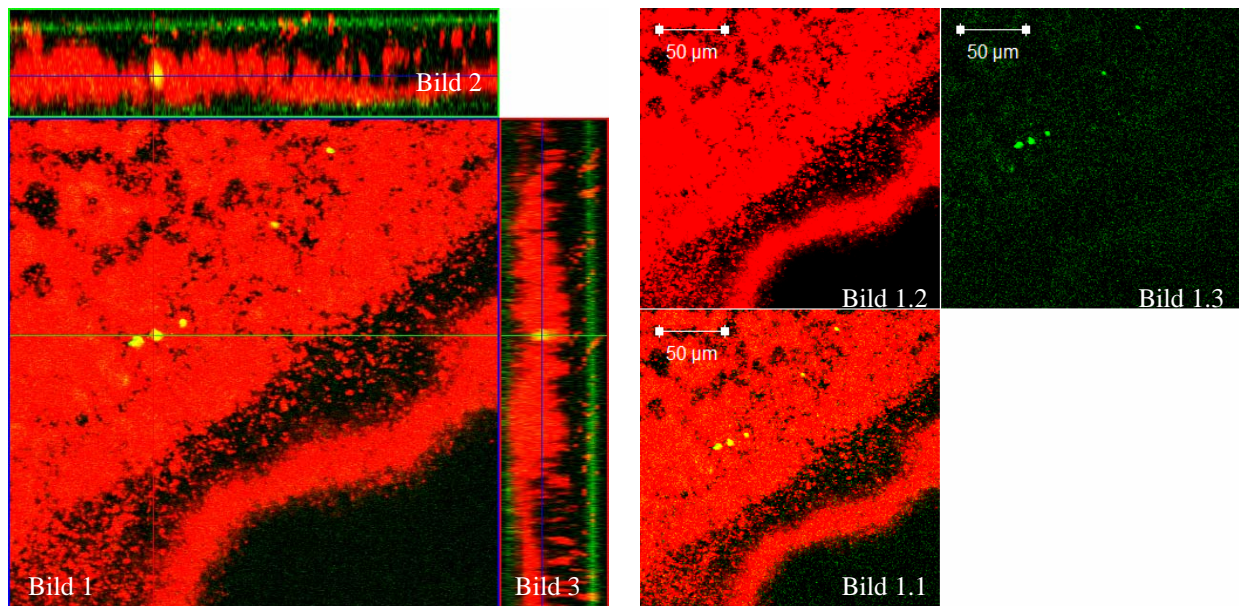
In den folgenden Bilderserien (Abb. 32 bis Abb. 34) zeigen Bild 1 bzw. 1.1. einen optischen Schnitt in der x-y-Ebene (Aufsicht). Bild 1.2 stellt eine SYTO 62-Färbung (rot, alle Zellen) und Bild 1.3 die entsprechende Lektin-Färbung da. Bild 1.1 bzw. Bild 1 ist das resultierende Bild aus der Überlagerung von Bild 1.2 und 1.3. Bild 2 stellt den Schnitt in der x-z-Ebene (Seitenansicht) entlang der grünen Linie, Bild 3 den Schnitt in der y-z-Ebene (Seitenansicht) entlang der roten Linie da. Die blaue Linie markiert die Position von Bild 1 im Bildstapel.



**Abb. 32:** CLSM-Bilder eines 14 Tage alten Biofilms aus Trinkwasserbakterien bei 630-facher Vergrößerung. Rot wurden die Zellen und grün das Lektin LecB dargestellt.



**Abb. 33:** CLSM-Bilder eines 14 Tagen alten Biofilms aus Trinkwasserbakterien bei 400-facher Vergrößerung. Rot wurden die Zellen und grün das Lektin WGA dargestellt.



**Abb. 34:** CLSM-Bilder eines 14 Tagen alten Biofilms aus Trinkwasserbakterien bei 400-facher Vergrößerung. Rot wurden die Zellen und grün das Lektin ConA dargestellt.

Es war erkennbar, dass alle 3 Lektine Bereiche in den Biofilmen anfärben konnten. Daraus war zu schließen, dass entsprechende Kohlenhydrate (s. o.) in den Biofilmen vorhanden waren.

Würde sich also ein Lektin (z. B.: LecB), dessen Zielstruktur im Biofilm vorhanden ist, an einer Zelle befinden (z. B.: *P. aeruginosa*), so könnte eine Wechselwirkung stattfinden.

#### 4.2.3 Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme

Das Verhalten von verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen bezüglich der Einnistung und/oder Persistenz in Trinkwasserbiofilmen sollte untersucht werden. Dazu wurden 2 mucoide Stämme (SG81, FRD1) 4 nicht-mucoide Stämme (DSM 50071, PA14, PAO1 und SG81 R1) sowie 2 Lektin-Defekt-Mutanten ( $\Delta$ LecB und  $\Delta$ LecA $\Delta$ LecB) verwendet. Diese wurden für die Einnistungsexperimente 2-mal 3 Tage auf R2A bei 20 °C vorkultiviert. Nach der Anzucht erfolgte die Erstellung einer Bakteriensuspension in deionisiertem Wasser mit einer optischen Dichte von 0,3 bei 600 nm. Dies entsprach in etwa einer Zellzahl von  $10^8$  Zellen/ml. Anschließend wurde diese Bakteriensuspension mit dem Zielmedium (Trinkwasser, deionisiertes Wasser, 1:100 CASO-Lösung) verdünnt. Hierbei wurde in dem Inokulum (Animpfsuspension Start) eine Koloniezahl von ca.  $10^6$  KBE/ml eingestellt (siehe 3.3.2.3). Der Trinkwasserbiofilm nach 14 Tagen Anzucht auf EPDM wurde als Basis für die Einnistungsexperimente verwendet. Diese Biofilme erwiesen sich innerhalb eines Reaktors als reproduzierbar. Untersuchungen mit der Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) zeigten eine Ähnlichkeit der Population von ca. 71 % in unterschiedlichen Reaktorläufen (Bressler in prep.). Auch

Beobachtungen der Koloniemorphologie während der Untersuchungen zeigten ähnliche Kolonietypen und Verhältnisse dieser über den gesamten Versuchszeitraum (siehe 4.2.2). Somit sollten Unterschiede im Einnistungs- und Persistenzverhalten bezüglich der unterschiedlichen *P. aeruginosa*-Stämme kaum von dem Trinkwasserbiofilm beeinflusst werden.

Für die Inokulation wurden die Trinkwasserbiofilme 1 Tag lang in der Animpfsuspension inkubiert. Anschließend wurden die beimpften Biofilme in Trinkwasser überführt (siehe 3.3.2.3).

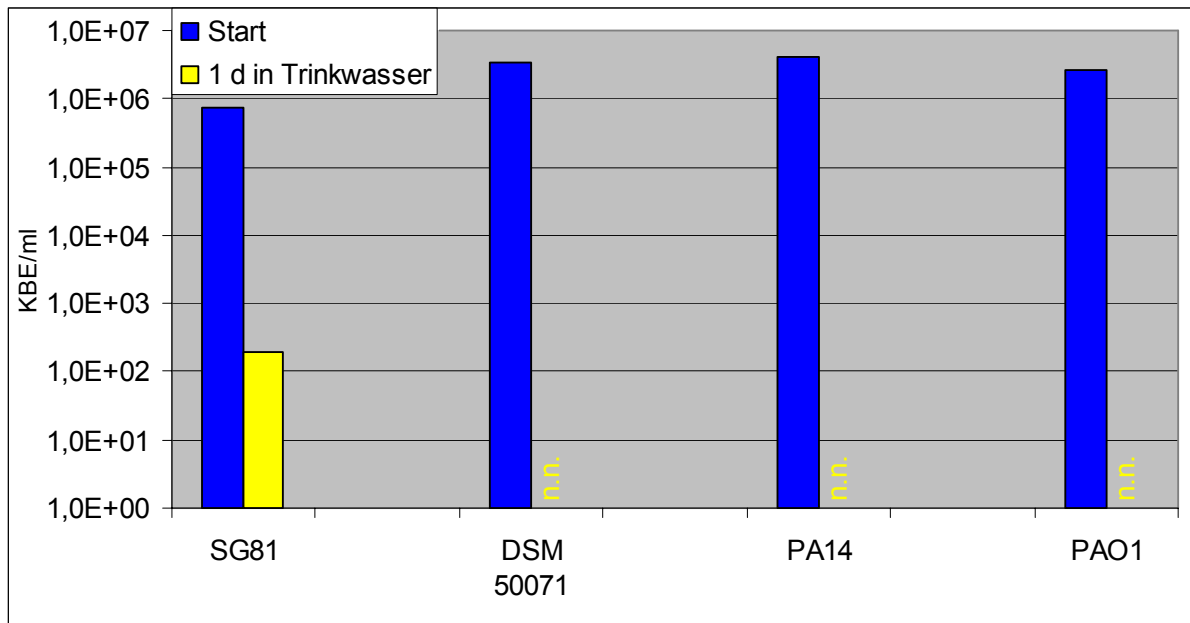
Bei den Einnistungsexperimenten wurde die Animpfsuspension vor (als Start gekennzeichnet) und nach der Inkubationsphase von einem Tag (als 0 d gekennzeichnet) untersucht. Biofilme wurden vor der Inkubation (Biofilm Kontrolle), nach der Inkubation (Biofilm 0 d) und nach 7 Tagen in Trinkwasser (Biofilm 7 d) untersucht. Für eine Biofilmuntersuchung wurde eine Seite des Coupons (ca. 15 cm<sup>2</sup>) abgeschabt und in 10 ml partikelfreiem sterilem deionisiertem Wasser suspendiert.

Während der Versuche konnte beobachtet werden, dass bei der Auswertung des HPC von Proben mit *P. aeruginosa*, bei Pigmentbildung, häufig keine Kolonien vom Typ 2 (siehe 4.2.2) im Hof des *P. aeruginosa* aufzufinden waren. Dies konnte bei den nicht-mucoiden *P. aeruginosa*-Stämmen (bei den mucoiden Stämmen SG81 und FRD1 war keine Pigmentbildung auf R2A erkennbar) beobachtet werden. Hierdurch konnte der HPC-Wert direkt beeinflusst werden, indem sich die Anzahl der erkennbaren Kolonien durch den hemmenden Effekt verringerte.

Häufig konnten die verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme auch auf R2A-Medium von anderen Kolonietypen unterschieden werden. Deshalb wurden diese auch auf dem R2A-Medium quantitativ erfasst. Dabei zeigte sich, dass vergleichbare Koloniezahlen der *P. aeruginosa*-Stämme wie bei der Standardmethode auf CN-Agar (siehe 3.3.3.2.2) zu beobachten waren. Meistens lagen die Koloniezahlen auf R2A sogar leicht über denen auf CN-Agar. Somit waren auf 2 unterschiedlichen Nährmedien vergleichbare Koloniezahlen für *P. aeruginosa* feststellbar.

#### 4.2.3.1 Wiederfindung von verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen in Trinkwasser

Um möglichst realistische Bedingungen zu simulieren, sollte *P. aeruginosa* in Trinkwasser suspendiert werden, um die Bakterien anschließend in Trinkwasserbiofilme einzunisten. Die Inkubationsphase sollte 1 Tag andauern. In einem orientierenden Versuch sollte untersucht werden, wie sich unterschiedliche *P. aeruginosa*-Stämme im Trinkwasser (Universität, Geibelstr. Labor U123), bezüglich ihrer Nachweisbarkeit über Kultivierungsmethoden, verhielten.



**Abb. 35:** Wiederfindung von *P. aeruginosa* in Trinkwasser nach eintägiger Inkubation. Die Koloniezahl von *P. aeruginosa* pro ml auf CN-Agar wurde zu Beginn des Versuches (Start) und nach 1 Tag in Trinkwasser bestimmt (n = 1). Die Flüssigkulturen wurden bei Raumtemperatur inkubiert. (n. n. = nicht nachweisbar)

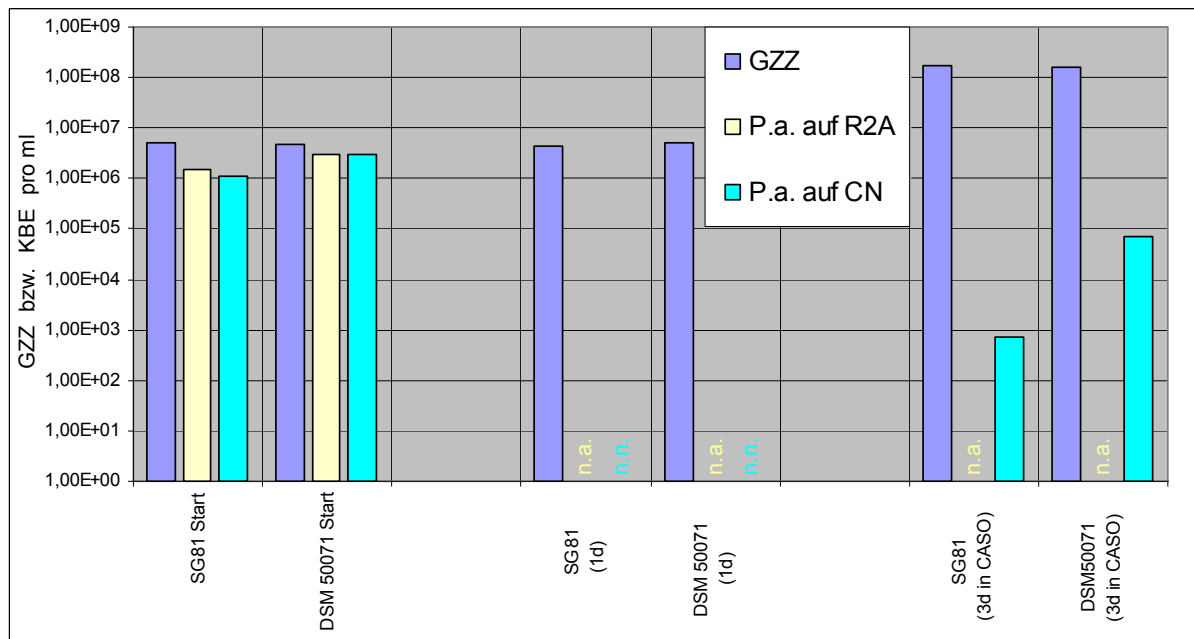
Wie zu erkennen ist (siehe Abb. 35), war nach der Expositionszeit (1 d) in Trinkwasser nur noch ein *P. aeruginosa*-Stamm (mucoider SG81) kulturell nachweisbar. Die 3 nicht-mucoiden Stämme konnten nicht mehr nachgewiesen werden.

In diesem Trinkwasser waren offenbar Inhaltsstoffe vorhanden, die *P. aeruginosa* inaktivieren konnten. Allerdings schien der mucoide *P. aeruginosa* SG81 besser gegen die inaktivierenden Trinkwasserinhaltsstoffe geschützt zu sein als die nicht-mucoiden Stämme.

Die nicht-mucoiden *P. aeruginosa*-Stämme waren in Trinkwasser nach 1 Tag nicht mehr nachweisbar. Nun sollte untersucht werden, ob *P. aeruginosa* (nicht-mucoider DSM 50071 oder mucoider SG81) durch Zugabe von Nährstoffen, nach der



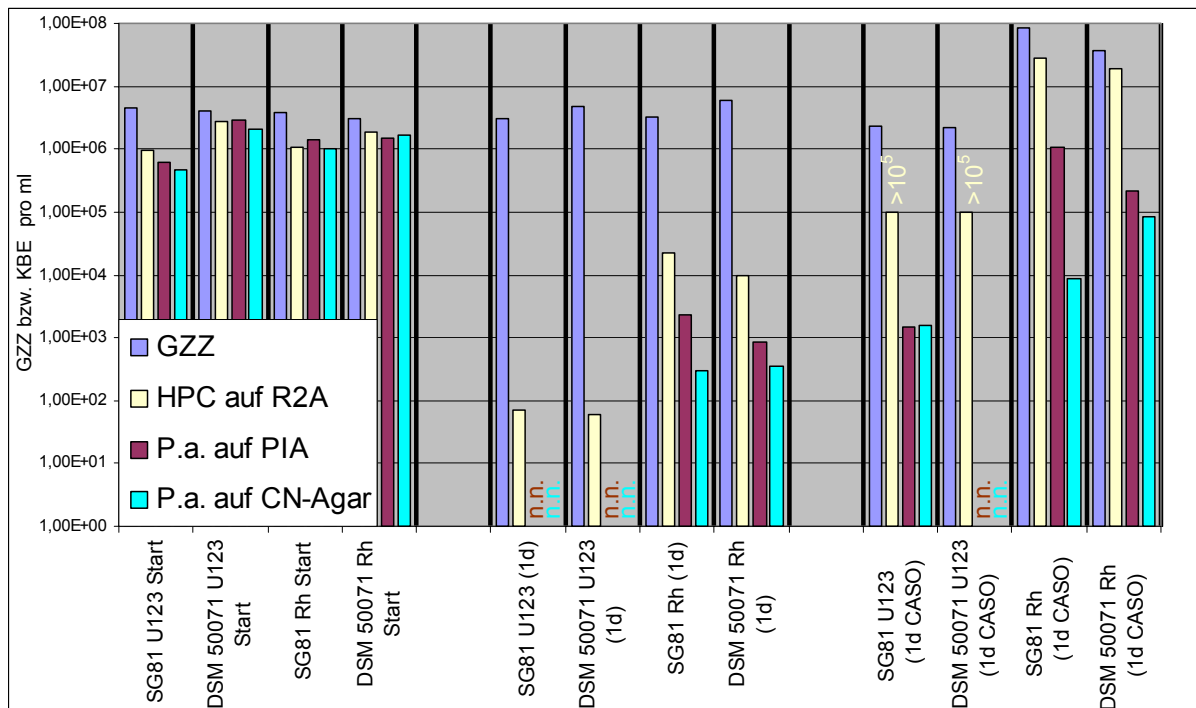
Exposition in Trinkwasser wieder kulturell (auf 2 unterschiedlichen Nährmedien) nachweisbar sein würden.



**Abb. 36:** Wiederfindung von *P. aeruginosa* in Trinkwasser nach eintägiger Inkubation und nach anschließender Exposition in Nährstofflösung (CASO-Lösung) (n = 1). *P. aeruginosa* wurde über 1 Tag in Trinkwasser inkubiert und anschließend wurde CASO-Lösung (1:100 CASO Endkonzentration) zugegeben. Dieser Ansatz wurde 3 Tage inkubiert. Bestimmt wurde die Gesamtzellzahl (GZZ) sowie die Koloniezahl von *P. aeruginosa* (P. a.) auf CN-Agar und R2A pro ml. Die Flüssigkulturen wurden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Koloniezahlen auf R2A waren nicht auswertbar (n. a.). (n. n. = nicht nachweisbar)

Wie aus Abb. 36 ersichtlich ist, war nach der Inkubationsphase von 1 Tag im Trinkwasser keiner der beiden *P. aeruginosa*-Stämme mehr kulturell nachweisbar. Nach Zugabe von organischem Nährstoff (1:100 CASO) waren nach 3 Tagen beide *P. aeruginosa*-Stämme wieder auffindbar. Wahrscheinlich handelte es sich um eine Vermehrung von verbliebenen *P. aeruginosa*-Zellen. Es wurde maximal 1 ml beprobt. Daher war nicht auszuschließen, dass in einem größeren Volumen noch *P. aeruginosa* nachweisbar gewesen wäre.

Das Trinkwasser aus der Hausinstallation (Labor U123) konnte *P. aeruginosa* inaktivieren. Um zu überprüfen, ob *P. aeruginosa* (nicht-mucoider DSM 50071 oder mucoider SG81) in einem anderen Trinkwasser (Rh = Duisburg-Rheinhausen, Hausinstallation, ca. 8 µg/l Kupfer, vergleichbare Chlorkonzentration (ca. 0,01 mg/l) wie das Laborwasser U123) kulturell nachweisbar bliebe oder falls nicht, durch Zugabe von Nährstoffen, nach der Exposition in Trinkwasser wieder kulturell (auf 3 unterschiedlichen Nährmedien) nachweisbar wäre. Zusätzlich wurde auch das Laborwasser (U123) untersucht.



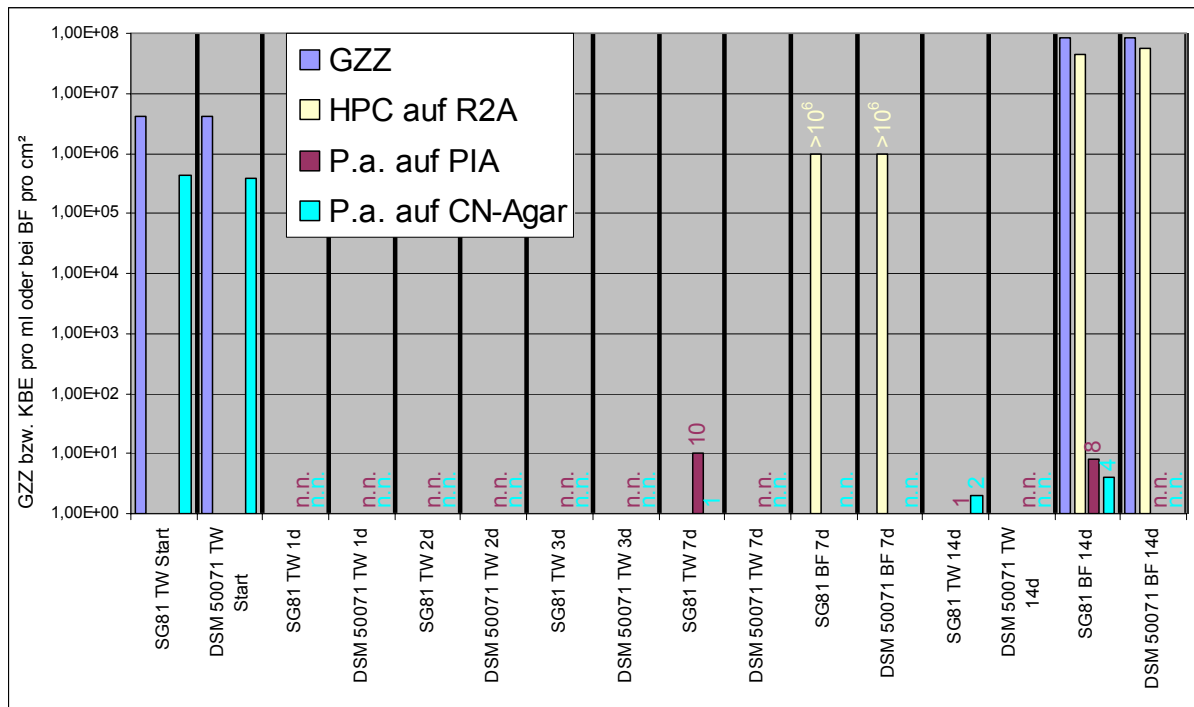
**Abb. 37:** Wiederfindung von *P. aeruginosa* in 2 unterschiedlichen Trinkwässern und nach anschließender Exposition in Nährstofflösung (CASO-Lösung) (n = 1). *P. aeruginosa* (*P. a.*) wurde über 1 Tag in Trinkwasser unterschiedlicher Herkunft inkubiert. Anschließend wurde CASO-Lösung (1:100 CASO Endkonzentration) zugegeben. Dieser Ansatz wurde 1 Tag inkubiert. Es wurde die Gesamtzellzahl sowie die Koloniezahl (KBE/ml) auf CN-Agar, PIA und R2A pro ml bestimmt. Die Flüssigkulturen wurden bei Raumtemperatur inkubiert. (n. n. = nicht nachweisbar)

Anhand der in Abb. 37 dargestellten Ergebnisse war festzustellen, dass nach 1 Tag im Trinkwasser keiner der beiden *P. aeruginosa*-Stämme in Trinkwasser aus der Hausinstallation (Labor U123) kulturell nachweisbar war. In Trinkwasser aus der Rheinhausener-Hausinstallation (Rh) konnten beide *P. aeruginosa*-Stämme, wenn auch in deutlich geringerer Konzentration (ca. 10<sup>3</sup> KBE/ml) als die Startkonzentration (ca. 10<sup>6</sup> KBE/ml), nachgewiesen werden. Nach einem Tag in Nährstofflösung (CASO 1:100) konnte auch ein Stamm (SG81) in dem Laborwasser (U123) wieder nachgewiesen werden. Hierbei war eine Vermehrung wahrscheinlich (s. o.). Die beiden *P. aeruginosa*-Stämme im Rheinhausener Trinkwasser konnten nach der Zugabe von Nährstoff in höheren Koloniezahlen (ca. 10<sup>5</sup> KBE/ml) nachgewiesen werden als nach 1 Tag in Trinkwasser.

Anhand dieser Untersuchung war erkennbar, dass *P. aeruginosa* in Trinkwasser (abhängig von der Herkunft) nach 1 Tag mittels Kultivierungsverfahren nachgewiesen werden konnte.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob *P. aeruginosa* (nicht-mucoider DSM 50071 oder mucoider SG81) sich unter stagnierenden Bedingungen in

Trinkwasser (Labor U123) auf unbewachsenen EPDM-Coupons ansiedeln und persistieren konnte.



**Abb. 38:** : Wiederfindung von *P. aeruginosa*, nach Inkubation in Trinkwasser, in der Wasserphase und auf EPDM-Oberflächen (n = 1). *P. aeruginosa* (*P. a.*) wurde über 1 Tag in Trinkwasser (TW) inkubiert. Zu Versuchsbeginn wurden unbewachsene EPDM-Coupons in das Wasser eingehängt. Nach 0, 1, 2, 3, 7 und 14 Tagen wurde die Wasserphase beprobt. Nach 7 und 14 Tagen wurden Biofilme (BF) auf den Coupons beprobt. Es wurde die Gesamtzellzahl sowie die Koloniezahl auf CN-Agar, PIA und R2A bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. (n. n. = nicht nachweisbar)

Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abb. 38 dargestellt. Nach 1 Tag im Trinkwasser war keiner der beiden *P. aeruginosa*-Stämme kulturell nachweisbar.

Nach 7 Tagen konnte *P. aeruginosa* SG81 in der Wasserphase nachgewiesen werden. Es konnte anhand des HPC-Wertes auf Biofilmbildung in beiden Ansätzen auf den EPDM-Coupons geschlossen werden. Allerdings konnte keiner der beiden *P. aeruginosa*-Stämme in den Biofilmen über Kultivierungsverfahren nachgewiesen werden.

Nach 14 Tagen konnte *P. aeruginosa* SG81 sowohl in der Wasserphase als auch in dem Biofilm nachgewiesen werden. *P. aeruginosa* DSM 50071 war weder in der Wasserphase noch in dem Biofilm nachweisbar.

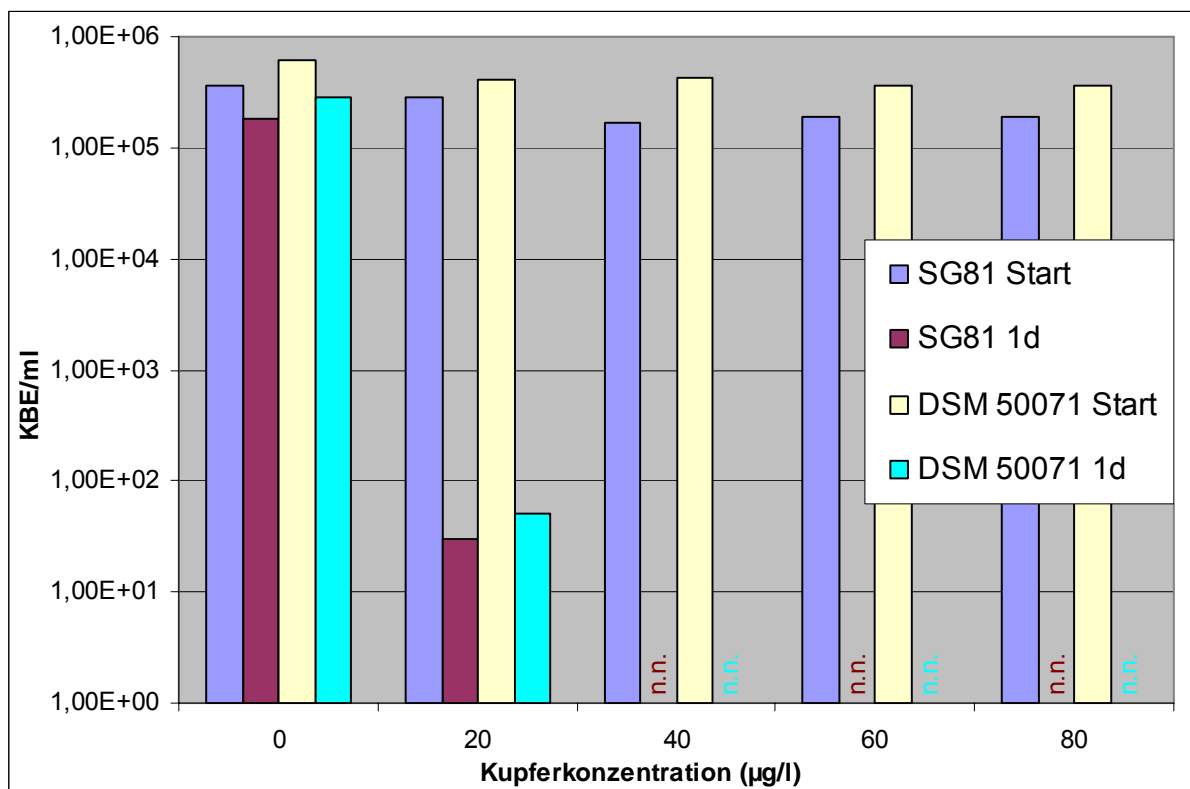
Obwohl beide Stämme in vergleichbarer Konzentration eingesetzt wurden und auch die Koloniezahlen zu Beginn vergleichbar waren, konnte nur der mucoide Stamm SG81 nach 14 Tagen im Biofilm und Trinkwasser nachgewiesen werden. Im Trinkwasser kam es zu keiner erkennbaren Vermehrung von *P. aeruginosa* SG81. Der nicht-mucoide Stamm war nicht nachweisbar.



Diese Versuchsreihe zeigte, dass das Trinkwasser des Labors (U123) eine inaktivierende Wirkung auf *P. aeruginosa* hatte. Der mucoide Stamm schien besser gegen die schädlichen Inhaltsstoffe geschützt zu sein. Vermutlich wurden nicht alle *P. aeruginosa* Bakterien inaktiviert. Somit konnte es bei Nährstoffzufuhr zu einer Vermehrung kommen. In einem anderen Trinkwasser (Rheinhausener-Hausinstallation) konnte *P. aeruginosa* auch nach 1 Tag in Trinkwasser nachgewiesen werden.

#### 4.2.3.2 Wirkung von Kupfer auf *P. aeruginosa*

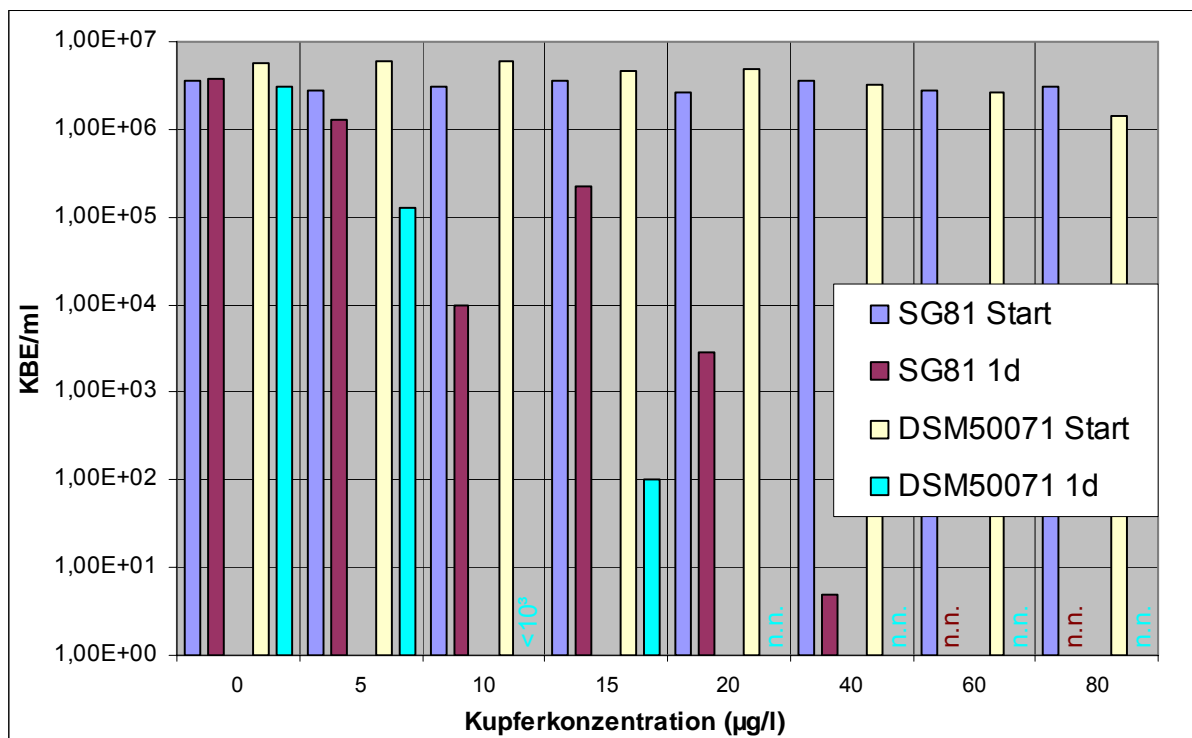
Das Trinkwasser der Universität (Geibelstr. Labor U123) konnte *P. aeruginosa* innerhalb von 1 Tag bei einer Koloniezahl von ca.  $10^6$  KBE/ml nahezu vollständig inaktivieren. Es war bekannt, dass Kupfer toxisch auf Bakterien (einschließlich *P. aeruginosa*) wirken konnte (z. B.: Huang et al. 2008). Da die Hausinstallation der Universität Kupferleitungen aufwies, wurde die Kupferkonzentration im Trinkwasser bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass ca. 80 µg/l Kupfer nachgewiesen werden konnten. Deshalb sollte der Einfluss von Kupfer-Ionen auf *P. aeruginosa* getestet werden. Dazu wurden 2 *P. aeruginosa* Stämme (nicht-mucoider DSM 50071 und mucoider SG81) in 4 verschiedenen konzentrierten Kupfersulfatlösungen (20, 40, 60 und 80 µg/l Kupfer, hergestellt aus Kupferlösung 1) über Nacht inkubiert.



**Abb. 39:** Wiederfindung von *P. aeruginosa* in verschiedenen konzentrierten Kupferlösungen (n = 1). *P. aeruginosa* wurde über 1 Tag in verschiedenen konzentrierten Kupferlösungen inkubiert und die Koloniezahl auf CN-Agar bestimmt. Die Flüssigkulturen wurden bei Raumtemperatur inkubiert. (n. n. = nicht nachweisbar)

Ab 40 µg/l Kupfer waren beide *P. aeruginosa*-Stämme bei einer Ausgangskoloniezahl von ca.  $10^5$  KBE/ml kulturell nicht mehr nachweisbar (siehe Abb. 39). 20 µg/l Kupfer führten innerhalb der Zeitspanne (1 Tag) zu einer Verringerung der Koloniezahl um nahezu 4 log-Stufen.

Um einen genaueren Eindruck zu erhalten, wurden die Kupferkonzentrationen feiner aufgegliedert. Die beiden *P. aeruginosa* Stämme (nicht-mucoider DSM 50071 und mucoider SG81) wurden in 7 verschiedenen konzentrierten Kupfersulfatlösungen (5, 10, 15, 20, 40, 60 und 80 µg/l Kupfer, hergestellt aus Kupferlösung 2) über Nacht inkubiert.



**Abb. 40:** Wiederfindung von *P. aeruginosa* in verschiedenen konzentrierten Kupferlösungen (n = 1). *P. aeruginosa* wurde über 1 Tag in verschiedenen konzentrierten Kupferlösungen inkubiert und die Koloniezahl auf CN-Agar bestimmt. Die Flüssigkulturen wurden bei Raumtemperatur inkubiert. (n. n. = nicht nachweisbar)

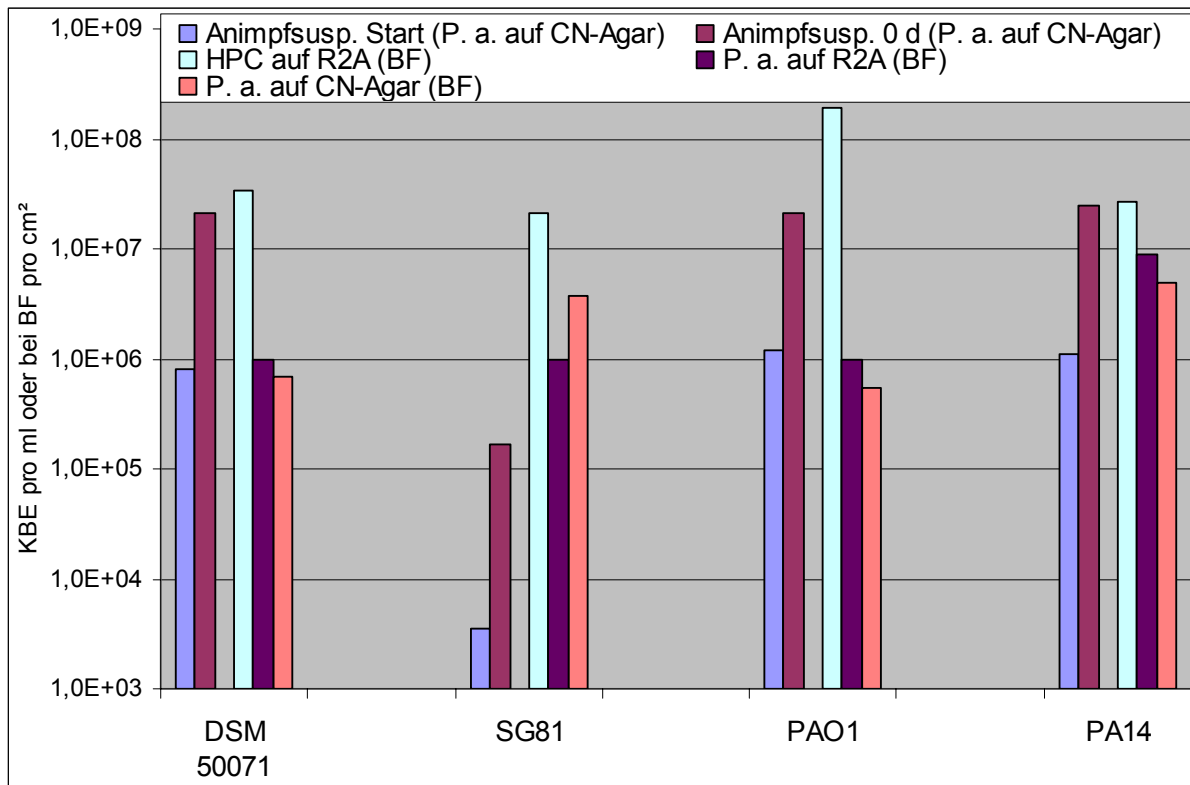
Die Untersuchung zeigte, dass ab 20 µg/l Kupfer der nicht-mucoiden *P. aeruginosa* DSM 50071 und ab 40 µg/l Kupfer der mucoiden *P. aeruginosa* SG81 kulturell nicht mehr nachweisbar war (siehe Abb. 40). Die Koloniezahl bei Versuchsbeginn (Start) lag bei ca.  $10^6$  KBE/ml. Ab 5 µg/l Kupfer war bei dem nicht-mucoiden Stamm eine Verringerung der Koloniezahl um ca. 1 log-Stufe zu erkennen. Der mucoiden Stamm zeigte ab 10 µg/l Kupfer einen erkennbaren Effekt. Hierbei war eine Verringerung der Koloniezahl um ca. 2 log-Stufen festzustellen.

Beide Versuche zeigten, dass Kupfer in trinkwasserrelevanten Konzentrationen (ca. 80 µg/l) *P. aeruginosa* DSM 50071 und SG81 für den kulturellen Nachweis

unzugänglich machen konnte. Der mucoide Stamm (SG81) schien besser gegen Kupfer geschützt zu sein als der nicht mucoide Stamm (DSM 50071).

#### 4.2.3.3 Vorversuche zur Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme

Das Trinkwasser der Hausinstallation konnte *P. aeruginosa* in suspendierter Form bei einer Koloniezahl von ca.  $10^6$  KBE/ml binnen eines Tages nahezu vollständig inaktivieren. Eine mögliche Ursache dafür konnte Kupfer im Trinkwasser sein. Untersuchungen an 2 *P. aeruginosa*-Stämmen (siehe 4.2.3.2) zeigten, dass eine Kupferkonzentration von 80 µg/l ausreichen konnte, um *P. aeruginosa* innerhalb von 1 Tag bei einer Koloniezahl von ca.  $10^6$  KBE/ml vollständig zu inaktivieren. Um dieser Inaktivierung entgegenzuwirken, wurde das Trinkwasser mit organischen Nährstoffen versetzt (1:100 CASO). Es war bekannt, dass unter diesen Bedingungen eine Inaktivierung nicht beobachtet werden konnte (Bressler 2002) und es möglich war, *P. aeruginosa* über 1 Tag in Trinkwasser anhand von Kultivierungsmethoden nachzuweisen. Es sollte nun untersucht werden, ob sich verschiedene *P. aeruginosa*-Stämme in 14 Tage alte Biofilme aus Trinkwasserbakterien einnisten ließen (siehe Abb. 41). Dafür wurden die 14 Tage alten Biofilme unter Stagnationsbedingungen in *P. aeruginosa*-Suspensionen eingetaucht und verblieben für 1 Tag in den entsprechenden Suspensionen. Abweichend von den anderen Einnistungsexperimenten (siehe 3.3.2.3) wurde hier zur Erstellung der Zellsuspension (Suspension der Zellen direkt von dem Anzuchtmedium) nicht deionisiertes Wasser sondern eine Trinkwasser-CASO-Lösung verwendet. Hierbei war zu erkennen, dass sich *P. aeruginosa* SG81 nur schlecht suspendieren ließ. Deshalb wurde in den weiteren Versuchen deionisiertes Wasser als Suspensionsmedium verwendet.



**Abb. 41:** Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme. Es wurden 4 verschiedene *P. aeruginosa*-Stämme (P. a.) über 1 Tag in Trinkwasserbiofilme eingenistet. Die Wasserphase wurde vor (Animpfsusp. Start) und nach der Inkubation (Animpfsusp. 0 d) beprobt. Die Biofilme (BF) wurden nur nach der Inkubation beprobt. Es wurde die Koloniezahl pro  $\text{cm}^2$  bzw. ml auf R2A und CN-Agar und bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

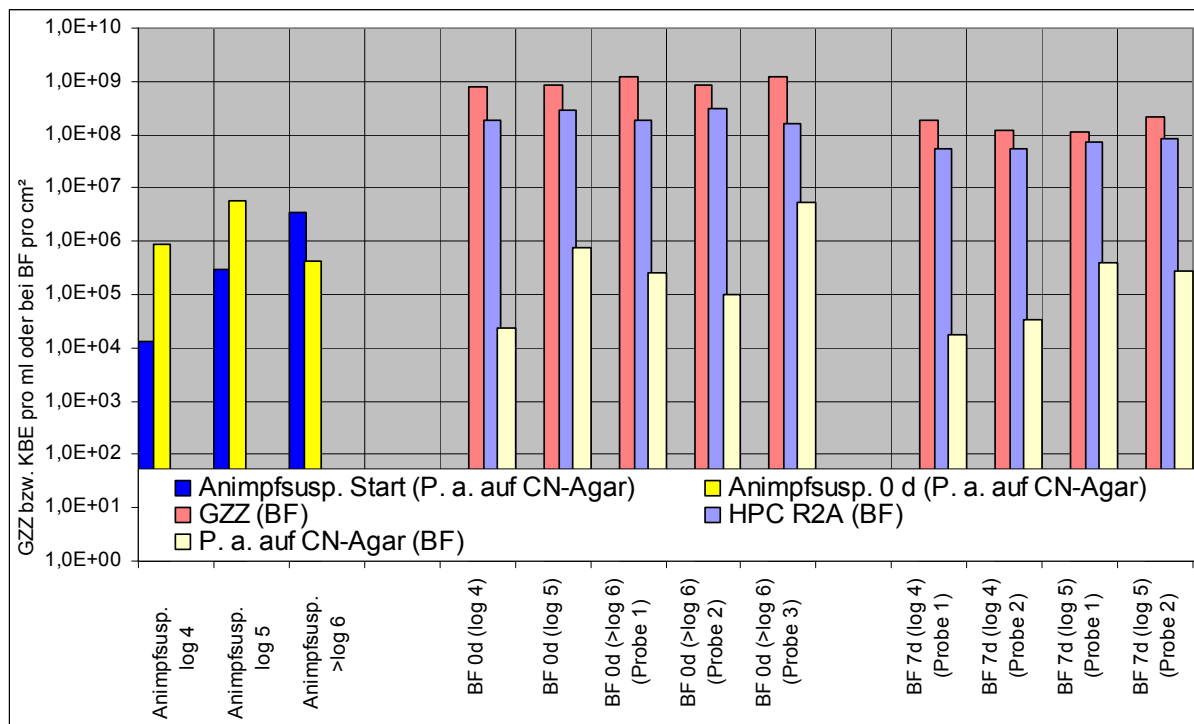
Wie in Abb. 41 dargestellt ist, waren alle 4 Stämme von *P. aeruginosa* nach der Inkubation in den Biofilmen auf beiden Nährmedien (in vergleichbaren Koloniezahlen) nachweisbar. Die Einnistung der Stämme *P. aeruginosa* DSM 50071, PAO1 und PA14 wurde in Animpfsuspension mit ca.  $10^6$  KBE/ml und bei SG81 mit ca.  $10^3$  KBE/ml durchgeführt. Die Koloniezahl der *P. aeruginosa*-Stämme im Biofilm, direkt nach der Einnistung, lag im Bereich von  $10^6$  KBE/ml ( $5,4 \times 10^5$  bis  $4,9 \times 10^6$  KBE/ml). Während der Einnistungsphase konnte eine Vermehrung von *P. aeruginosa* in der Animpfsuspension um ca. 1 log-Stufe bei allen 4 Test-Stämmen beobachtet werden. Obwohl die Koloniezahl von *P. aeruginosa* SG81 in der Animpfsuspension um mehr als 2 log-Stufen niedriger war als bei den anderen Stämmen, konnten vergleichbare Koloniezahlen in allen 4 Biofilmen gefunden werden.

Somit war es möglich *P. aeruginosa* durch Verwendung von CASO-Lösung in Trinkwasserbiofilme einzunisten.

#### 4.2.3.4 Einnistung von *P. aeruginosa* DSM 50071 in Trinkwasserbiofilme

Durch den Einsatz von CASO-Lösung (organischer Nährstoff) konnte *P. aeruginosa* in Trinkwasser überleben und in Biofilme eingenistet werden. Für den nicht mucoiden Typstamm *P. aeruginosa* DSM 50071 sollte untersucht werden, wie gut sich dieser in bestehende Trinkwasserbiofilme einnisten und dort für mindestens 7 Tage persistieren konnte.

Orientierend wurden Versuche mit verschiedenen Konzentrationen im Inokulum durchgeführt, um zu untersuchen, wie sich dies auf die Einnistung auswirken würde.



**Abb. 42:** Einnistung von *P. aeruginosa* DSM 50071 (*P. a.*) in Trinkwasserbiofilme mit unterschiedlichen Startkonzentrationen ( $n = 1$ ). Die Ergebnisse stammen aus 2 Versuchsansätzen. Ein zusammenhängender Versuch mit Konzentration in der Animpfsuspension (Animpfsusp. Start) von  $1,3 \times 10^4$  KBE/ml (log4) und  $3 \times 10^5$  KBE/ml (log5) und ein Versuch in dem die Animpfsuspension mit  $3,4 \times 10^6$  KBE/ml (>log6) angesetzt wurde. Es wurde die Gesamtzellzahl sowie Koloniezahl pro ml bzw. bei Biofilmen (BF) pro  $\text{cm}^2$  auf CN-Agar und R2A bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Aus Abb. 42 ist ersichtlich, dass sich die Koloniezahl der Animpfsuspension bei einer Startkonzentration mit ca.  $10^4$  KBE/ml während der Inkubation um ca. 2 log-Stufen erhöhte, während die Gesamtzellzahl um mehr als 3 log-Stufen zunahm (Daten nicht gezeigt). Die Koloniezahl der Animpfsuspension mit einer Startkonzentration von ca.  $10^5$  KBE/ml erhöht sich während der Inkubation um ca. 1 log-Stufe, während die Gesamtzellzahl um mehr als 2 log-Stufen anstieg (Daten nicht gezeigt). Die Koloniezahl der Animpfsuspension mit einer Startkonzentration von ca.  $10^6$  KBE/ml

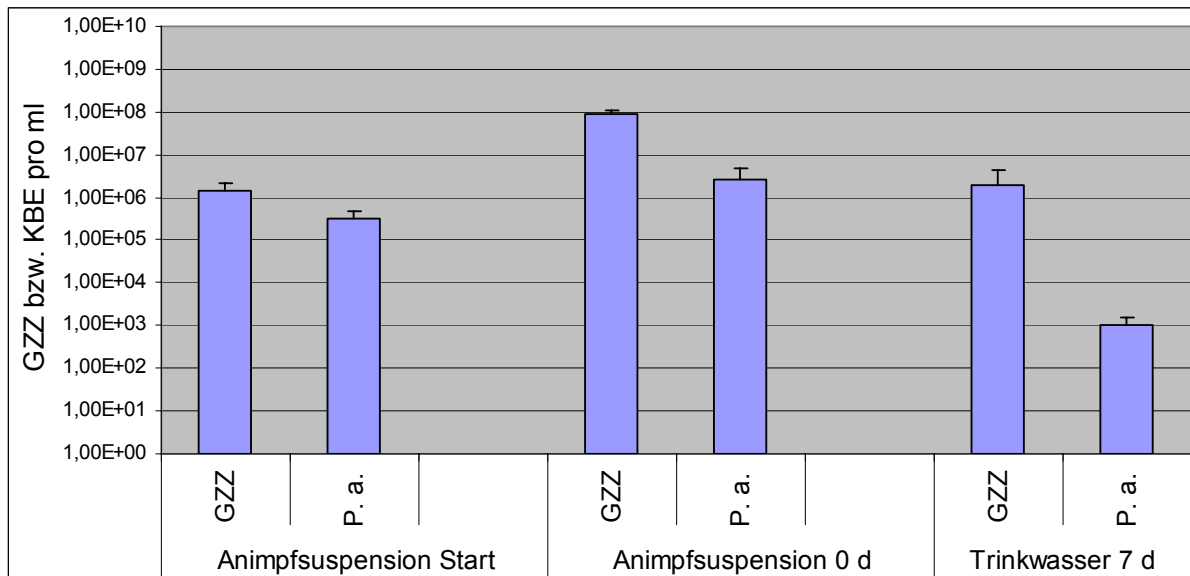
verringert sich, während der Inkubation um ca. 1 log-Stufe während die Gesamtzellzahl sich um mehr als 1,5 log-Stufen erhöht (Daten nicht gezeigt).

Eine geringer konzentrierte Animpfsuspension (ca.  $10^4$  KBE/ml) führte zu einer geringeren Koloniezahl (ca.  $10^4$  KBE/cm<sup>2</sup>) an *P. aeruginosa* DSM 50071 im Biofilm als eine höher konzentrierte Animpfsuspension (bei ca.  $10^5$  KBE/ml in der Animpfsuspension konnten ca.  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> im Biofilm nachgewiesen werden). Dieser Unterschied konnte auch nach 7 Tagen in Trinkwasser noch beobachtet werden. Lag die Konzentration der Animpfsuspension allerdings deutlich über  $10^6$  KBE/ml, wurden unterschiedliche Koloniezahlen von *P. aeruginosa* in den Biofilmen gefunden. In 2 von 3 Biofilmen wurde nach der Einnistung eine niedrigere Koloniezahl im Biofilm (ca.  $10^5$  KBE/cm<sup>2</sup>) nachgewiesen, als bei einer Animpfsuspension mit  $3 \times 10^5$  KBE/ml. Bei 1 von 3 Biofilmen wurde eine deutlich höhere Koloniezahl gefunden ( $5,5 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup>).

Aufgrund der Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass die Koloniezahl von *P. aeruginosa* in der Animpfsuspension einen Einfluss auf die Einnistung hatte. Eine geringere Koloniezahl in der Animpfsuspension führte zu einer geringeren Koloniezahl von *P. aeruginosa* im Biofilm. Aus diesem Grund wurde die Bakteriensuspension, aus der die Animpfsuspension erstellt wurde, bei den Einnistungsexperimenten anhand einer optischen Dichte von 0,3 bei 600 nm (ein Wert von 0,3 entsprach ca.  $10^8$  Zellen/ml) eingestellt. Aus dieser Suspension wurde dann das Inokulum (Animpfsuspension Start) mit einer Koloniezahl von *P. aeruginosa* von ca.  $10^6$  KBE/ml hergestellt.

Allerdings war die Koloniezahl in der Animpfsuspension nicht allein ausschlaggebend. Der physiologische Zustand von *P. aeruginosa* schien auch von Bedeutung dabei zu sein. Eine Verringerung der Koloniezahl in der Animpfsuspension während der Einnistungsphase konnte zu einer geringeren Koloniezahl von *P. aeruginosa* in den Biofilmen führen.

In 3 unabhängigen Experimenten sollte untersucht werden, wie sich *P. aeruginosa* DSM 50071 nach Einnistung in Trinkwasserbiofilme verhielt. Um besser einen Trend in den Ergebnissen erkennen zu können, wurden die Mittelwerte berechnet (siehe Abb. 43 und 44).

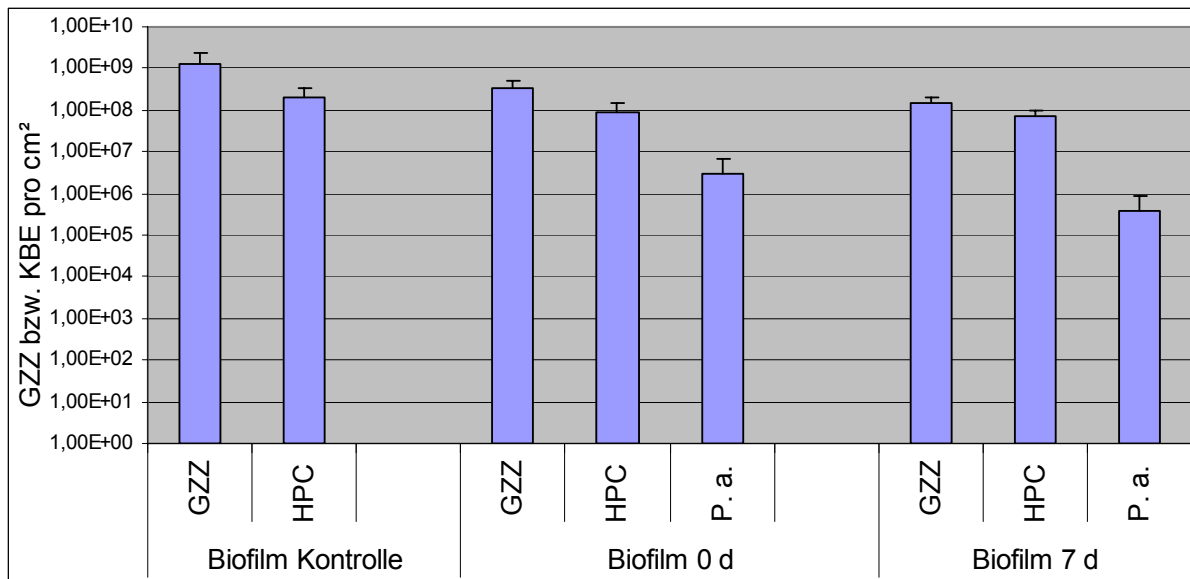


**Abb. 43:** Untersuchung der wässrigen Phasen von Einnistungsexperimenten mit *P. aeruginosa* DSM 50071. Es wurde die Gesamtzellzahl (GZZ) und die Koloniezahl von *P. aeruginosa* (P. a.) auf CN-Agar pro ml in den Animpfsuspensionen und dem Trinkwasser nach 7 Tagen Inkubation bestimmt. Die Versuche sind bei Raumtemperatur durchgeführt worden. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ( $n = 3$ ) angegeben.

In Abb. 43 wurden die Ergebnisse der wässrigen Phasen dargestellt. Die mittlere Gesamtzellzahl in der Start-Animpfsuspension (Animpfsuspension Start) lag bei ca.  $2 \times 10^6$  Zellen/ml, die Koloniezahl von *P. aeruginosa* DSM 50071 auf CN-Agar lag bei ca.  $3 \times 10^5$  KBE/ml. Somit waren ca. 15 % aller Zellen über das Kultivierungsverfahren nachweisbar.

Nach der Einnistung (Animpfsuspension 0 d) lag die mittlere Gesamtzellzahl in der Animpfsuspension bei  $9 \times 10^7$  Zellen/ml, die Koloniezahl von *P. aeruginosa* DSM 50071 auf CN-Agar bei ca.  $3 \times 10^6$  KBE/ml. Somit waren ca. 3 % aller Zellen über das Kultivierungsverfahren nachweisbar. Die mittlere Gesamtzellzahl erhöhte sich während der Einnistung um ca. 1,5-log-Stufen und die Koloniezahl von *P. aeruginosa* DSM 50071 um ca. 1-log-Stufe.

Im Trinkwasser ließ sich nach 7 Tagen *P. aeruginosa* DSM 50071 im Bereich von ca. 1000 KBE/ml nachweisen, dies entsprach ungefähr 0,05 % aller Zellen im Trinkwasser.



**Abb. 44:** Biofilme von Einnistungsexperimenten mit *P. aeruginosa* DSM 50071. Dieser wurde in Trinkwasserbiofilme eingenistet (0 d) und die Persistenz nach 7 Tagen Inkubation in Trinkwasser untersucht. Es wurde die Gesamtzellzahl (GZZ) und die Koloniezahl auf R2A (HPC) sowie die Koloniezahl von *P. aeruginosa* (P. a.) auf CN-Agar pro cm<sup>2</sup> bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (Kontrollbiofilm n = 3, Biofilm 0 d n = 4, Biofilm 7 d n = 5) angegeben.

Die in Abb. 44 gezeigten Ergebnisse der Biofilmuntersuchungen können wie folgt beschrieben werden. Die mittlere Gesamtzellzahl im Kontrollbiofilm (Biofilm nach 14 Tagen Anzucht, siehe 3.3.2) lag bei ca.  $1 \times 10^9$  Zellen/cm<sup>2</sup>, der HPC-Wert bei ca.  $2 \times 10^8$  KBE/cm<sup>2</sup>. Im Mittel waren ca. 20 % aller Zellen über den HPC nachweisbar.

Die mittlere Gesamtzellzahl im Biofilm nach der Einnistung (Biofilm 0 d) lag bei ca.  $3 \times 10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup>, der HPC-Wert bei ca.  $9 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup>. Somit waren ca. 30 % aller Zellen über den HPC nachweisbar. *P. aeruginosa* DSM 50071 war mit ca.  $3 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> aufzufinden. Dies entsprach ca. 1 % der Gesamtzellen oder ca. 3 % des HPC-Wertes.

Nach 7 Tagen im Trinkwasser lag die mittlere Gesamtzellzahl im Biofilm bei ca.  $2 \times 10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup> und der HPC-Wert bei ca.  $8 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup>. Somit waren ca. 40 % aller Zellen über den HPC nachweisbar. *P. aeruginosa* DSM 50071 konnte mit ca.  $4 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> nachgewiesen werden. Dies entsprach ca. 0,2 % der Gesamtzellen oder ca. 0,5 % des HPC-Wertes. Die Koloniezahl von *P. aeruginosa* DSM 50071 entsprach noch ca. 13 % der Koloniezahl von *P. aeruginosa* DSM 50071 nach der Einnistung (Einnistungskonzentration). Die Gesamtzellzahlen und HPC-Werte der Biofilme bleiben über den Versuchszeitraum in vergleichbarer Größenordnung.



Die Untersuchungen an *P. aeruginosa* DSM 50071 zeigten, dass er nach der Einnistung in den Biofilm deutlich besser gegen Trinkwasserinhaltsstoffe geschützt war als in suspendierter Form. Nach 7 Tagen im Trinkwasser unter stagnierenden Bedingungen konnte *P. aeruginosa* im Biofilm (mit ca.  $10^5$  KBE/cm<sup>2</sup>) noch nachgewiesen werden. Auch in der Wasserphase ließ er sich nach 7 Tagen auffinden. Wahrscheinlich ist dies aber nicht auf Resistenzausbildung gegen Wasserinhaltsstoffe zurückzuführen, sondern eher auf die Inaktivierung der schädlichen Stoffe.

Eine Untersuchung mit unterschiedlichen Suspensionsmedien für die Einnistung (CASO-Lösung, Trinkwasser und deionisiertes Wasser) sollte zeigen, ob dabei Unterschiede in der Einnistung von *P. aeruginosa* DSM 50071 in Trinkwasserbiofilme beobachtet werden konnten (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Einnistung von *P. aeruginosa* DSM 50071 in Trinkwasserbiofilme mit unterschiedlichen Suspensionsmedien.

Probe	Parameter	CASO-Lösung	Trinkwasser	deionisiertes Wasser
Biofilm Kontrolle	GZZ/cm <sup>2</sup>	$4,3 \times 10^8$		
	HPC/cm <sup>2</sup>	$1,3 \times 10^8$		
Animpf-suspension Start	GZZ/ml	$1,4 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$7,3 \times 10^6$
	P. a./ml	$6,3 \times 10^5$	$1,9 \times 10^6$	$7,0 \times 10^5$
Animpf-suspension 0 d	GZZ/ml	$3,7 \times 10^7$	$8,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^7$
	P. a./ml	$8,3 \times 10^6$	n.n.	$5,0 \times 10^5$
Biofilm 0 d	GZZ/cm <sup>2</sup>	Probe 1: $2,8 \times 10^8$	Probe 1: $3,4 \times 10^8$	Probe 1: $3,7 \times 10^8$
		Probe 2: $3,2 \times 10^8$	Probe 2: $3,3 \times 10^8$	Probe 2: $3,6 \times 10^8$
	HPC/cm <sup>2</sup>	Probe 1: $1,2 \times 10^8$	Probe 1: $3,4 \times 10^7$	Probe 1: $6,7 \times 10^7$
		Probe 2: $8,3 \times 10^7$	Probe 2: $5,7 \times 10^7$	Probe 2: $6,2 \times 10^7$
	P. a./cm <sup>2</sup>	Probe 1: $6,4 \times 10^5$	Probe 1: 31	Probe 1: $6,3 \times 10^2$
		Probe 2: $1,3 \times 10^6$	Probe 2: 39	Probe 2: $1,4 \times 10^3$

n. n. = nicht nachweisbar

Die Einnistung unter Verwendung von CASO-Lösung führt zu Ergebnissen, die ähnlich der vorherigen Ergebnisse lagen (vgl. Tabelle 8 und S. 99). Es konnten direkt nach der Einnistung (0 d) ca.  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> *P. aeruginosa* DSM 50071 im Biofilm nachgewiesen werden. Im Ansatz mit Trinkwasser ließ sich erwartungsgemäß kein

*P. aeruginosa* in der Animpfsuspension nach Inkubation (0 d) mittels Kultivierungsmethode mehr nachweisen. Immerhin waren geringe Mengen (31 bzw. 39 KBE/cm<sup>2</sup>) im Biofilm nachweisbar. Im Ansatz mit deionisiertem Wasser konnte in der Animpfsuspension nur eine geringe Abnahme der Koloniezahl beobachtet werden (von  $7 \times 10^5$  auf  $5 \times 10^5$  KBE/ml). Die Gesamtzellzahl veränderte sich kaum (Zunahme um ca. 37 %). Im Biofilm wurden entgegen der Erwartung nur geringe Koloniezahlen (630 bzw. 1400 KBE/cm<sup>2</sup>) an *P. aeruginosa* nachgewiesen. Dies ließ die Vermutung zu, dass sich *P. aeruginosa* DSM 50071 aktiv vermehren muss, um sich in Trinkwasserbiofilme einzunisten. Deshalb sollte der physiologische Zustand von *P. aeruginosa* während der Einnistungsphase, für die Bewertung der Einnistung, nicht außer Acht gelassen werden.

#### **4.2.3.5 Einfluss des mucoiden Phänotyps auf die Einnistung in Trinkwasserbiofilme**

Es sollte untersucht werden, wie gut sich die mucoiden *P. aeruginosa*-Stämme FRD1 und SG81 sowie die nicht-mucoide spontane Revertante SG81 R1 in bestehende Trinkwasserbiofilme einnisten und dort für mindestens 7 Tage persistieren konnte.

Für *P. aeruginosa* SG81 und FRD1 war bekannt, dass diese Stämme Alginate produzieren konnten (SG81 Grobe et al. 1995, FRD1 Ohman und Chakrabarty 1981). Es war allerdings unklar, ob es ihnen auch möglich sein würde, Alginate auf dem R2A-Medium (dies wurde zur Anzucht bei den Einnistungsexperimenten verwendet) zu produzieren.

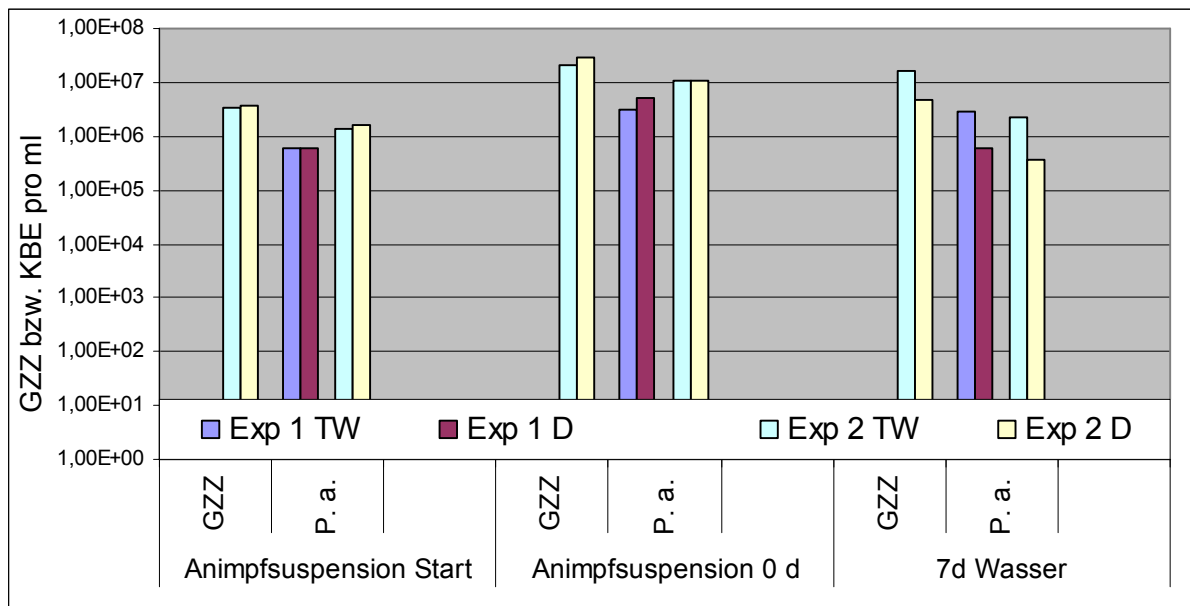
Unter Standard-Anzuchtbedingungen wurden beide Stämme 2-mal 3 Tage auf R2A-Medium bei 20 °C angezüchtet. In der zweiten 3-Tage-Periode war nach 2 Tagen auf R2A Schleimbildung erkennbar. Hierbei konnten Uronsäuren in den EPS nachgewiesen werden. In dem Lyophilisat (gefriergetrocknete EPS) waren es bei SG81 ca. 90 % und bei FRD1 ca. 80 % der gesamten EPS. Nach 3 Tagen auf R2A konnte ein Verlust des mucoiden Erscheinungsbildes beobachtet werden. In diesem Zustand war deutlich weniger Uronsäure nachweisbar. In dem Lyophilisat war es bei SG81 ca. 9 % und bei FRD1 ca. 33 % der gesamten EPS.

Bei der Anzucht für die Einnistungsexperimente wurden Einzelkolonieausstriche angefertigt. Hierbei war erkennbar, dass nach 3 Tagen in dicht bewachsenen Bereichen der Bewuchs sein mucoides Erscheinungsbild verlor, während in schwach bewachsenen Bereichen das mucoide Erscheinungsbild noch erkennbar war.

Unter Berücksichtigung der EPS-Analytik war anzunehmen, dass *P. aeruginosa* SG81 und FRD1 nach 3 Tagen auf R2A von Alginate umgeben sein können.

Das "Verschwinden" des mucoiden Erscheinungsbildes (Verlust von Alginate) nach 3 Tagen auf R2A konnte nur auf diesem Medium beobachtet werden. Ein Kontrollansatz auf PIA zeigte nicht den Verlust des mucoiden Erscheinungsbildes.

In orientierenden Versuchen sollte untersucht werden, ob sich *P. aeruginosa* SG81 auf unbewachsenen EPDM-Coupons unter Standardeinnistungsbedingungen (1:100 CASO) ansiedeln und dort für mindestens 7 Tage persistieren konnte. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob sich Uronsäuren (Alginatbausteine, dies wäre ein Hinweis auf Alginatproduktion des mucoiden Stamms) in den gebildeten Biofilmen nachweisen lassen würde. Hierfür wurden Parallelproben in Trinkwasser (TW) und in deionisiertem Wasser (D) angesetzt, da zu überprüfen war, ob *P. aeruginosa* SG81 aus Trinkwasserinhaltsstoffen oder aus EPDM in der Lage sein würde, uronsäurehaltige EPS-Bestandteile zu produzieren.

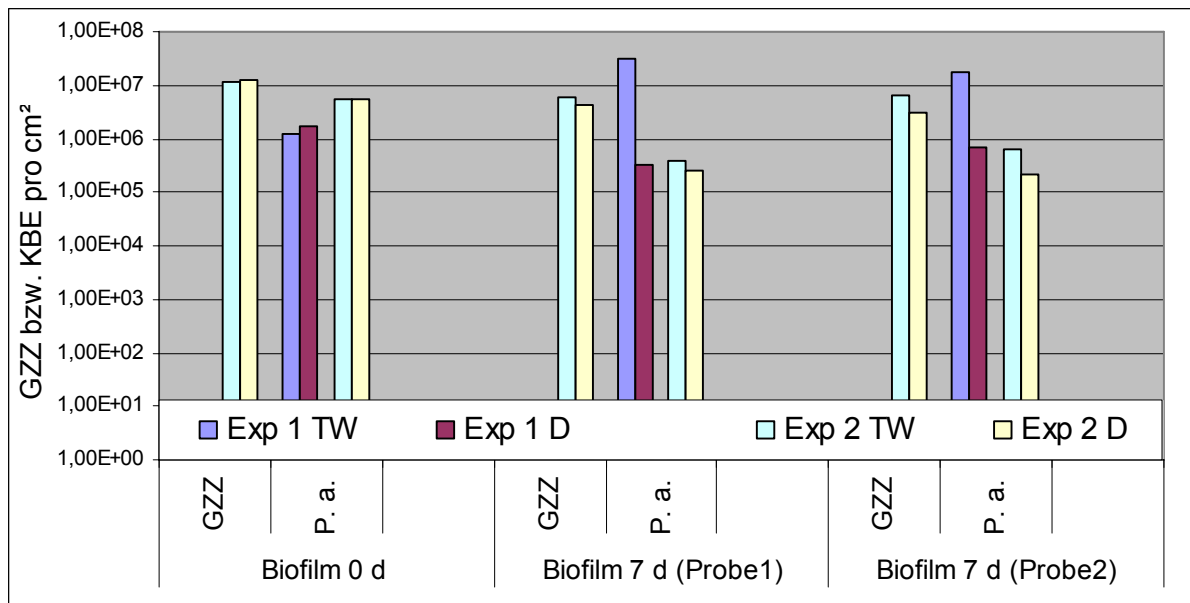


**Abb. 45:** Untersuchung der wässrigen Phasen von Besiedlungsexperimenten mit *P. aeruginosa* SG81 (n = 1). Es wurde die Gesamtzellzahl (GZZ) (die Gesamtzellzahl wurde in Experiment 1 nicht bestimmt) und die Koloniezahl von *P. aeruginosa* auf CN-Agar (P. a.) pro ml in den Animpfsuspensionen, im Trinkwasser (TW) und im deionisierten Wasser (D) nach 7 Tagen Inkubation, bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. In Experiment 1 (Exp 1) wurde eine Mischkultur aus *P. aeruginosa* SG81 und SG81 R1 verwendet. Bei Experiment 2 (Exp 2) wurde eine *P. aeruginosa* SG81 Reinkultur verwendet.

Anhand der in Abb. 45 dargestellten Ergebnisse ist erkennbar, dass in Experiment 2 die Gesamtzellzahl von *P. aeruginosa* SG81 in den Start-Animpfsuspensionen bei ca.  $3 \times 10^6$  Zellen/ml, die Koloniezahl auf CN-Agar bei ca.  $1 \times 10^6$  KBE/ml lag. Somit waren ca. 30 % aller Zellen über das Kultivierungsverfahren nachweisbar. In Experiment 1 lag die Koloniezahl von *P. aeruginosa* SG81 auf CN-Agar bei ca.  $6 \times 10^5$  KBE/ml. Die Gesamtzellzahl wurde nicht bestimmt. Nach der Inkubation lag in Experiment 2 die Gesamtzellzahl bei ca.  $2 \times 10^7$  Zellen/ml und die Koloniezahl von *P. aeruginosa* SG81 auf CN-Agar bei ca.  $1 \times 10^7$  KBE/ml. Somit waren ca. 50 % aller Zellen über das Kultivierungsverfahren nachweisbar. Die Gesamtzellzahl und die Koloniezahl von *P. aeruginosa* SG81 hatte sich jeweils um ca. 1 log-Stufe erhöht.

Die Koloniezahl von *P. aeruginosa* SG81 in Experiment 2 lag bei über  $10^6$  KBE/ml und hatte sich somit um ca. eine log-Stufe erhöht.

*P. aeruginosa* SG81 war in beiden Experimenten im Trinkwasser und in deionisiertem Wasser nach 7 Tagen Inkubation nachweisbar. Die Koloniezahlen in beiden Wässern (Trinkwasser, deionisiertes Wasser) lag bei ca.  $10^6$  KBE.



**Abb. 46:** Biofilme von Besiedlungsexperimenten mit *P. aeruginosa* SG81 (n = 1). Es wurde die Gesamtzellzahl (GZZ) sowie die Koloniezahl von *P. aeruginosa* auf CN-Agar pro cm² bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. In Experiment 1 wurde eine Mischkultur aus *P. aeruginosa* SG81 und SG81 R1 verwendet. In diesem Experiment wurde die Gesamtzellzahl nicht bestimmt. Bei Experiment 2 wurde eine *P. aeruginosa* SG81 Reinkultur verwendet.

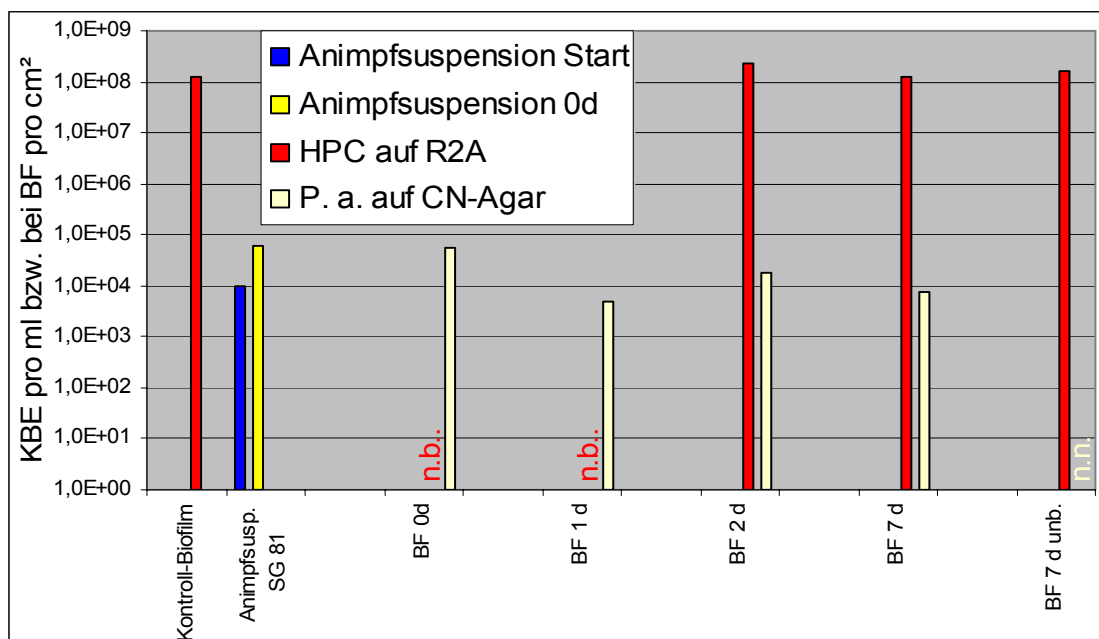
Wie anhand der in Abb. 46 dargestellten Untersuchungen der Biofilme zu erkennen ist, konnte *P. aeruginosa* SG81 unbewachsene EPDM-Oberflächen besiedeln und sich dort für mindestens 7 Tage halten, unabhängig davon, ob das umgebende Medium Trinkwasser oder deionisiertes Wasser war. Direkt nach der Inkubation lag die Koloniezahl im Biofilm in allen Proben bei ca.  $10^6$  KBE/cm². Die Koloniezahl im Biofilm nach 7 Tagen lag in 6 von 8 Biofilmen bei ca.  $10^6$  KBE/cm². In 2 von 8 Biofilmen kam es zu einer Vermehrung von *P. aeruginosa* um ca. eine log-Stufe (auf ca.  $10^7$  KBE/cm²). *P. aeruginosa* konnte in den Wasserphasen mit ca.  $10^6$  KBE/ml nachgewiesen werden.

In beiden Experimenten konnten keine Uronsäuren (Alginat) in den Biofilmen nachgewiesen werden. Somit konnte *P. aeruginosa* SG81 weder aus Trinkwasserinhaltsstoffen noch aus EPDM-Bestandteilen Uronsäuren in nachweisbaren Mengen produzieren.

Aus dieser Untersuchung konnte gefolgert werden, dass in Gegenwart von Nährstoffen (1:100 CASO) *P. aeruginosa* SG81 unbewachsene Oberflächen

besiedeln und dort persistieren konnte. Eingenistet in den Biofilm zeigte *P. aeruginosa* SG81 eine geringere Sensitivität gegen inaktivierende Trinkwasserinhaltsstoffe als in suspendierter Form. In Trinkwasser und im Biofilm war *P. aeruginosa* nach 7 Tagen noch nachweisbar. Wahrscheinlich ist dies aber nicht auf Resistenzausbildung gegen Wasserinhaltsstoffe, sondern eher auf die Inaktivierung der schädlichen Stoffe zurückzuführen. *P. aeruginosa* SG81 ist wahrscheinlich nicht in der Lage EPDM als Nährstoffquelle zu verwenden, da eine Vermehrung innerhalb von 7 Tagen nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte.

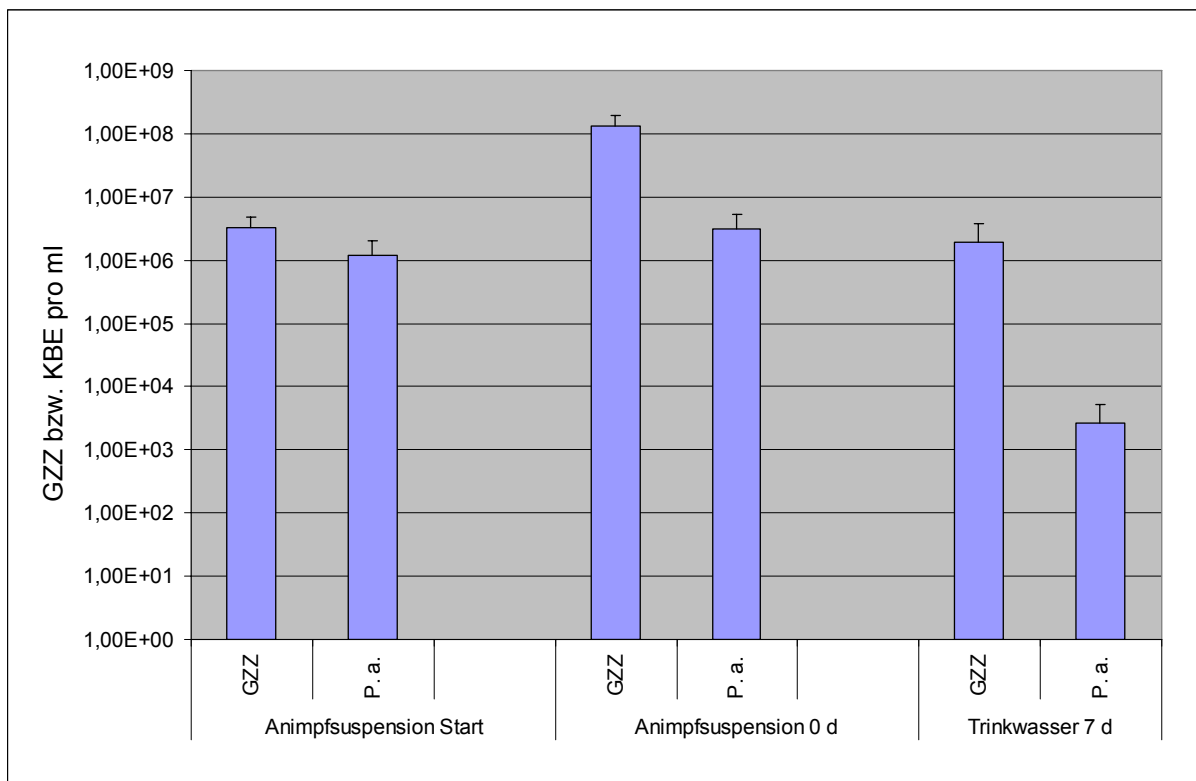
In einem orientierenden Experiment sollte überprüft werden, ob sich unter statischen Bedingungen (siehe 3.3.2, abweichend wurde hier eine 1:1000 CASO-Lösung verwendet) in Trinkwasserbiofilme eingenisteter *P. aeruginosa* SG81 unter Durchflussbedingungen in Trinkwasserbiofilmen halten konnte. Des Weiteren wurde untersucht, ob er in der Lage sein würde, über die Wasserphase einen unbeimpften Trinkwasserbiofilm zu kolonisieren. Dazu wurde *P. aeruginosa* SG81 unter statischen Bedingungen in Trinkwasserbiofilme eingenistet und anschließend die beimpften Biofilme wieder in den Kleinreaktor eingesetzt. Ein unbeimpfter Trinkwasserbiofilm (BF unb.) verblieb im Kleinreaktor. Zwischen den wieder eingesetzten Coupons und dem unbeimpften Trinkwasserbiofilm wurden 2 Stellplätze (ca. 1,5 cm) freigelassen, um einen direkten Kontakt zu vermeiden.



**Abb. 47:** Untersuchung der Animpfsuspension (Animpfsusp.) und der Biofilme eines Einnistungsexperimentes mit *P. aeruginosa* SG81 im Trinkwasserdurchfluss (n = 1). *P. aeruginosa* SG81 wurde unter statischen Bedingungen in einen Trinkwasserbiofilm (BF) eingenistet und anschließend Trinkwasser im Durchfluss ausgesetzt. Es wurde die Koloniezahl pro ml bzw. pro cm<sup>2</sup> auf R2A (HPC) und CN-Agar (P. a.) bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Koloniezahlen auf R2A bei den Proben Biofilmproben (BF 0d, 1d) konnten nicht bestimmt werden (n. b.). (n .n. = nicht nachweisbar)

Nach der Einnistung konnte *P. aeruginosa* SG81 mit ca.  $10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> in dem Trinkwasserbiofilm nachgewiesen werden (siehe Abb.47). Die Koloniezahl von *P. aeruginosa* SG81 in den Trinkwasserbiofilmen nahm nach Kontakt mit Trinkwasser um ca. 1 log-Stufe ab, bewegte sich dann aber in einem Bereich um  $10^4$  KBE/cm<sup>2</sup> über den Versuchszeitraum von 7 Tagen. In dem unbeimpften Trinkwasserbiofilm konnte nach 7 Tagen *P. aeruginosa* nicht nachgewiesen werden. Dieses Experiment zeigte, dass auch unter Durchflussbedingungen *P. aeruginosa* SG81 nach 7 Tagen in Trinkwasser in einem Trinkwasserbiofilm noch auffindbar war. Eine Kolonisierung von Trinkwasserbiofilmen mit *P. aeruginosa* SG81 über die Wasserphase konnte nicht nachgewiesen werden.

Das Verhalten von *P. aeruginosa* SG81 nach Einnistung in Trinkwasserbiofilme sollte in 5 unabhängigen Versuchen untersucht werden. Um einen Trend in den Ergebnissen besser erkennen zu können, wurden die Mittelwerte berechnet (siehe Abb. 48 und 49).



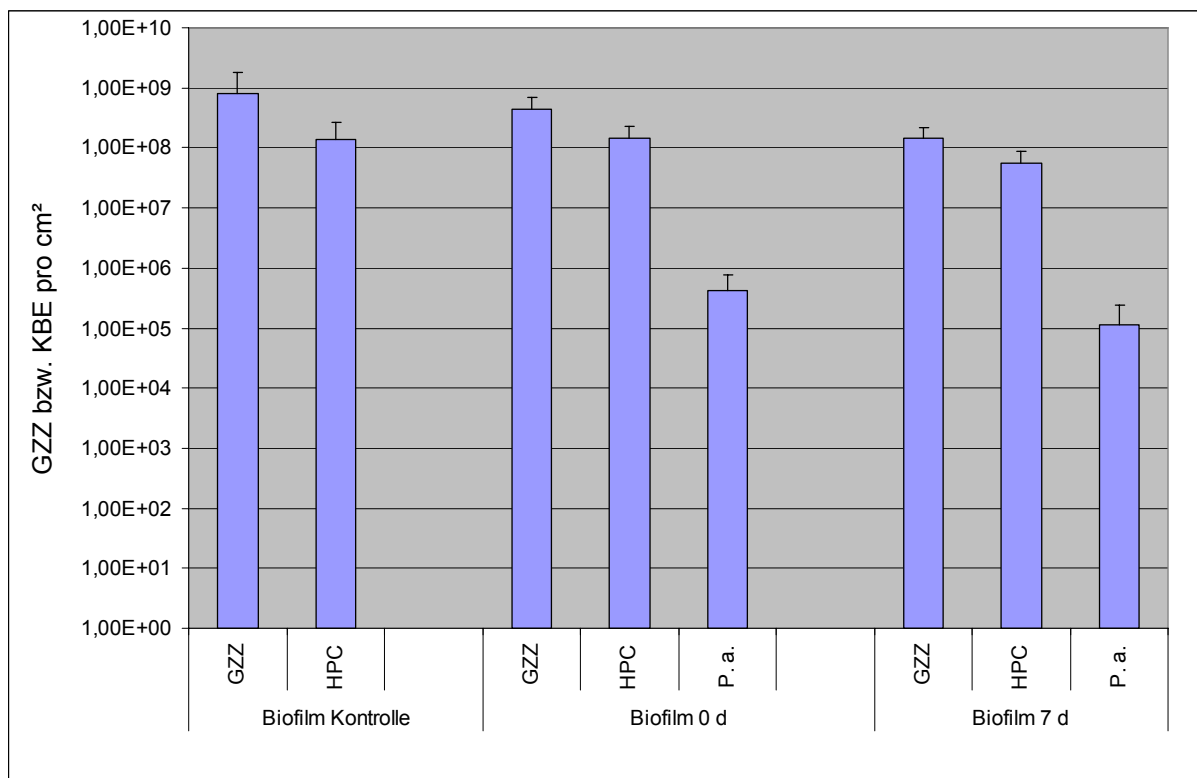
**Abb. 48:** Untersuchung der wässrigen Phasen von Einnistungsexperimenten mit *P. aeruginosa* SG81. Es wurde die Gesamtzellzahl (GZZ) und die Koloniezahl von *P. aeruginosa* (P. a.) auf CN-Agar pro ml in den Animpfsuspensionen und dem Trinkwasser nach 7 Tagen Inkubation bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (n = 5) angegeben.

In Abb. 48 wurden die Ergebnisse der Untersuchungen von den wässrigen Phasen dargestellt. Dabei war erkennbar, dass die mittlere Gesamtzellzahl der Start-Animpfsuspension bei ca.  $3 \times 10^6$  Zellen/ml und die Koloniezahl von *P. aeruginosa*

SG81 auf CN-Agar bei ca.  $1 \times 10^6$  KBE/ml lag. Somit waren ca. 30 % aller Zellen über das Kultivierungsverfahren nachweisbar.

Nach der Einnistung (0 d) lag die mittlere Gesamtzellzahl in der Animpfsuspension bei ca.  $1 \times 10^8$  Zellen/ml, die Koloniezahl von *P. aeruginosa* SG81 auf CN-Agar bei ca.  $3 \times 10^6$  KBE/ml. Somit waren ca. 3 % aller Zellen über das Kultivierungsverfahren nachweisbar. Die Koloniezahl von *P. aeruginosa* SG81 hatte sich im Verlauf der Einnistung näherungsweise verdreifacht. Im gleichen Zeitraum erhöht sich die mittlere Gesamtzellzahl um ca. 2 log-Stufen.

Im Trinkwasser ließ sich nach 7 Tagen *P. aeruginosa* SG81 lediglich in 3 von 5 Proben nachweisen. Allerdings nur in 2 Proben mit ca. 1000 KBE/ml, dies entsprach ungefähr 0,1 % aller Zellen im Trinkwasser. In einer Probe waren weniger als 100 KBE/ml nachweisbar.



**Abb. 49:** Biofilme von Einnistungsexperimenten mit *P. aeruginosa* SG81. Dieser wurde in Trinkwasserbiofilme eingenistet (0 d) und die Persistenz nach 7 Tagen Inkubation in Trinkwasser untersucht. Es wurde die Gesamtzellzahl (GZZ) und die Koloniezahl auf R2A (HPC) sowie die Koloniezahl von *P. aeruginosa* (P. a.) auf CN-Agar pro cm<sup>2</sup> bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (Kontrollbiofilm n = 5, Biofilm 0 d n = 6, Biofilm 7 d n = 9) angegeben.

Wie aus der Darstellung der Biofilmuntersuchungen (siehe Abb. 49) zu entnehmen ist, lag die mittlere Gesamtzellzahl im Kontrollbiofilm bei ca.  $8 \times 10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup>, der HPC-Wert bei ca.  $1 \times 10^8$  KBE/cm<sup>2</sup>. Somit waren ca. 13 % aller Zellen über den HPC nachweisbar.

Die mittlere Gesamtzellzahl im Biofilm nach der Einnistung (0 d) lag bei ca.  $4 \times 10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup>, der HPC-Wert bei ca.  $1 \times 10^8$  KBE/cm<sup>2</sup>. Somit waren ca. 25% aller Zellen über den HPC nachweisbar. *P. aeruginosa* SG81 war mit ca.  $4 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> nachweisbar. Dies entsprach ca. 0,1 % der Gesamtzellen oder ca. 0,4 % des HPC-Wertes. Bei der Entnahme der Biofilme wurde die Ablösung von größeren Bereichen des Biofilms beobachtet.

Nach 7 Tagen im Trinkwasser lag die mittlere Gesamtzellzahl im Biofilm bei ca.  $1 \times 10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup> und der HPC-Wert bei ca.  $6 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup>. Es waren ca. 60 % aller Zellen über den HPC nachweisbar. *P. aeruginosa* SG81 war mit ca.  $1 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> nachweisbar. Dies entsprach ca. 0,1 % der Gesamtzellen oder ca. 0,2 % des HPC-Wertes. Die mittlere Koloniezahl von *P. aeruginosa* SG81 entsprach noch ca. 25 % der Einnistungskonzentration (Koloniezahl von *P. aeruginosa* SG81 nach der Einnistung). Die Gesamtzellzahlen und HPC-Werte der Biofilme bleiben über den Versuchszeitraum in vergleichbarer Größenordnung.

In einem Experiment wurde untersucht, ob sich Uronsäuren in den Biofilmen nachweisen lassen würden. Diese ließen sich in keinem der Biofilme nachweisen. Weder im Kontrollbiofilm noch direkt nach der Einnistung und auch nicht in den beiden Biofilmen nach 7 Tagen.

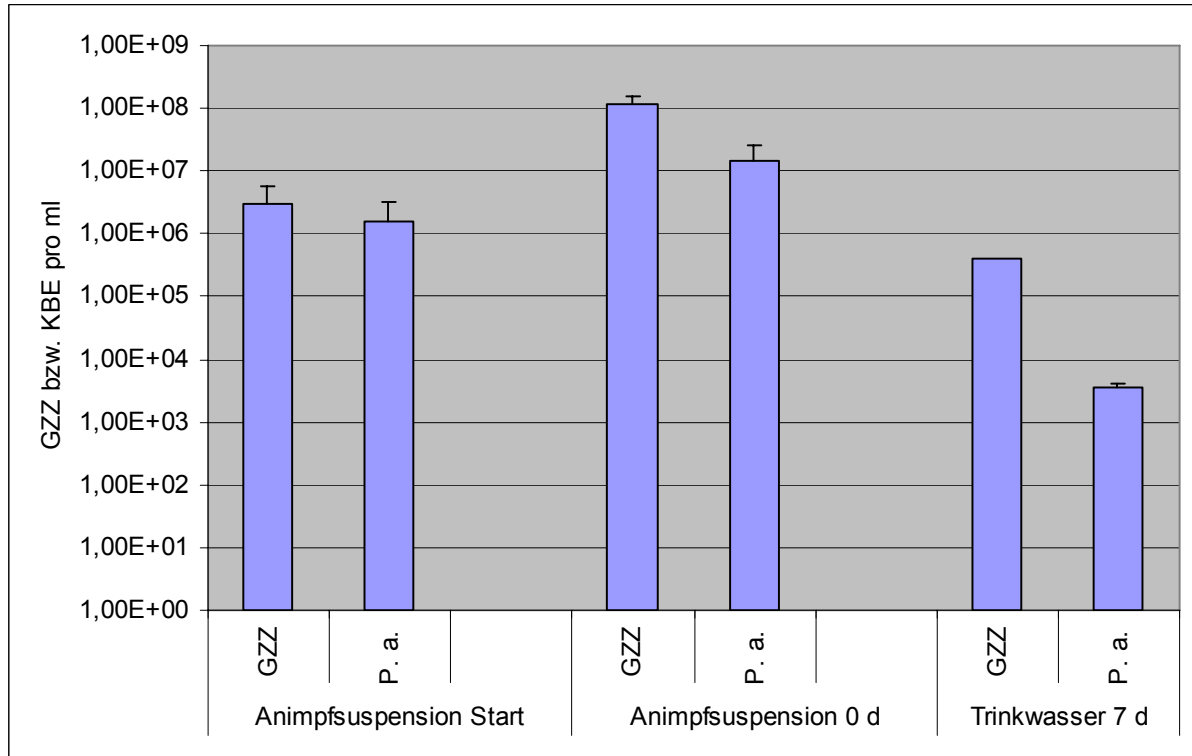
Aus der Untersuchungsreihe an *P. aeruginosa* SG81 ließ sich folgern, dass *P. aeruginosa* SG81 eingenistet in einen Biofilm eine geringere Sensitivität gegenüber inaktivierende Trinkwasserinhaltsstoffe aufwies als in suspensierter Form. Bei den Stagnationsversuchen konnte im Biofilm (ca.  $10^5$  KBE/cm<sup>2</sup>) und im Trinkwasser *P. aeruginosa* nach 7 Tagen noch nachgewiesen werden. Wahrscheinlich ist dies aber nicht auf Resistenzausbildung gegen Wasserinhaltsstoffe, sondern eher auf die Inaktivierung der schädlichen Stoffe zurückzuführen. *P. aeruginosa* SG81 konnte unbewachsene EPDM-Oberflächen besiedeln und im Trinkwasserdurchfluss mindestens 7 Tage in einem Biofilm persistieren.

Bei verschiedenen Einnistungsexperimenten wurde der Uronsäuregehalt von Trinkwasserbiofilmen nach 14 Tagen Anzucht zu bestimmen (n = 3). Uronsäuren konnten nicht nachgewiesen werden.

Uronsäuren konnten auch in Trinkwasserbiofilmen mit *P. aeruginosa* SG81 nicht nachgewiesen werden.



Bei dem nicht-mucoiden *P. aeruginosa* SG81 R1 (Spontanmutante von SG81) sollte ebenfalls untersucht werden, wie er sich nach Einnistung in Trinkwasserbiofilme verhalten würde. Dazu wurden 2 unabhängige Versuche angesetzt. Um einen Trend in den Ergebnissen besser erkennen zu können, wurden die Mittelwerte berechnet (siehe Abb. 50 und 51).

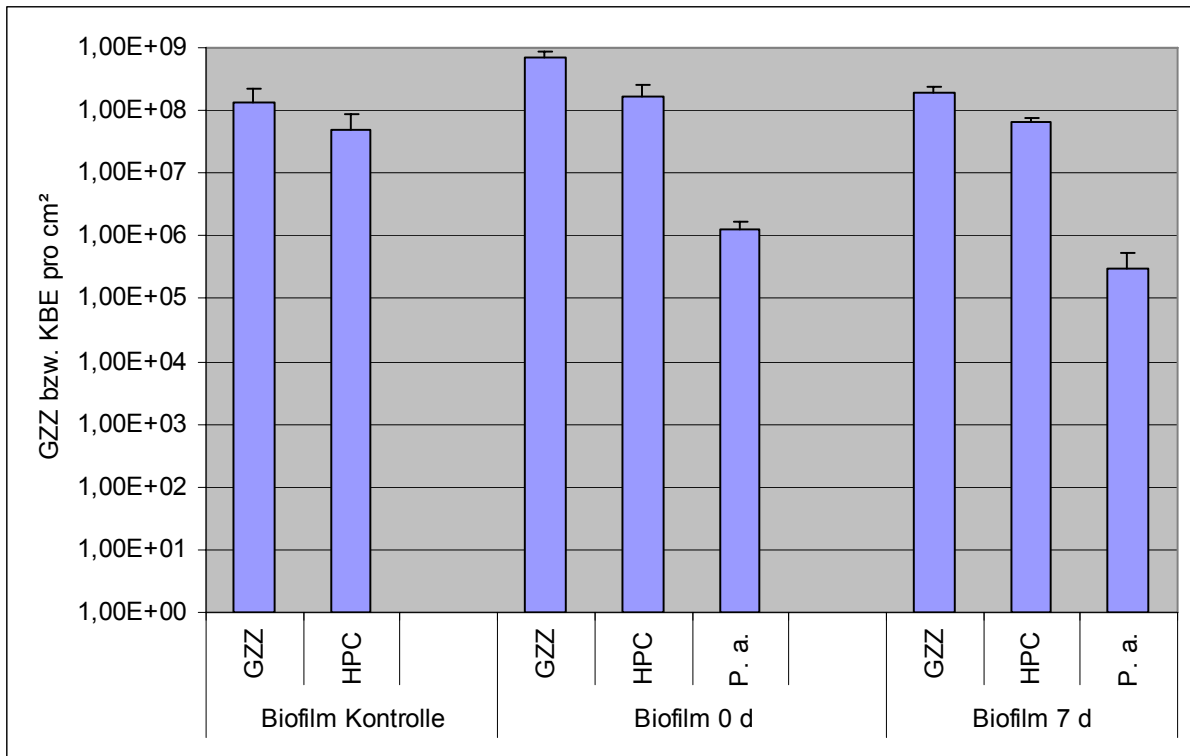


**Abb. 50:** Untersuchung der wässrigen Phasen von Einnistungsexperimenten mit *P. aeruginosa* SG81 R1. Es wurde die Gesamtzellzahl (GZZ) und die Koloniezahl von *P. aeruginosa* (P. a.) auf CN-Agar pro ml in den Animpfsuspensionen und dem Trinkwasser nach 7 Tagen Inkubation bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (n = 2) angegeben.

Wie in Abb. 50 gezeigt, lag die mittlere Gesamtzellzahl in der Start-Animpfsuspension bei ca.  $3 \times 10^6$  Zellen/ml, die Koloniezahl von *P. aeruginosa* SG81 R1 auf CN-Agar bei ca.  $2 \times 10^6$  KBE/ml. Somit waren ca. 60 % aller Zellen über das Kultivierungsverfahren nachweisbar.

Nach der Einnistung (0 d) lag die mittlere Gesamtzellzahl in der Animpfsuspension bei ca.  $1 \times 10^8$  Zellen/ml, die Koloniezahl von *P. aeruginosa* SG81 R1 auf CN-Agar bei ca.  $1 \times 10^7$  KBE/ml. Somit waren ca. 10 % aller Zellen über das Kultivierungsverfahren nachweisbar. Die mittlere Gesamtzellzahl erhöhte sich im Verlauf der Einnistung um ca. 1,5-log-Stufen, während sich die Koloniezahl von *P. aeruginosa* SG81 R1 näherungsweise verfünffachte.

Im Trinkwasser ließ sich nach 7 Tagen *P. aeruginosa* SG81 R1 in beiden Experimenten im Bereich von ca. 1000 KBE/ml nachweisen, dies entsprach ungefähr 1 % aller Zellen im Trinkwasser.



**Abb. 51:** Biofilme von Einnistungsexperimenten mit *P. aeruginosa* SG81 R1. Dieser wurde in Trinkwasserbiofilme eingenistet (0 d) und die Persistenz nach 7 Tagen Inkubation in Trinkwasser untersucht. Es wurde die Gesamtzellzahl (GZZ) und die Koloniezahl auf R2A (HPC) sowie die Koloniezahl von *P. aeruginosa* (P. a.) auf CN-Agar pro cm<sup>2</sup> bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (Kontrollbiofilm n = 2, Biofilm 0 d n = 2, Biofilm 7 d n = 4) angegeben.

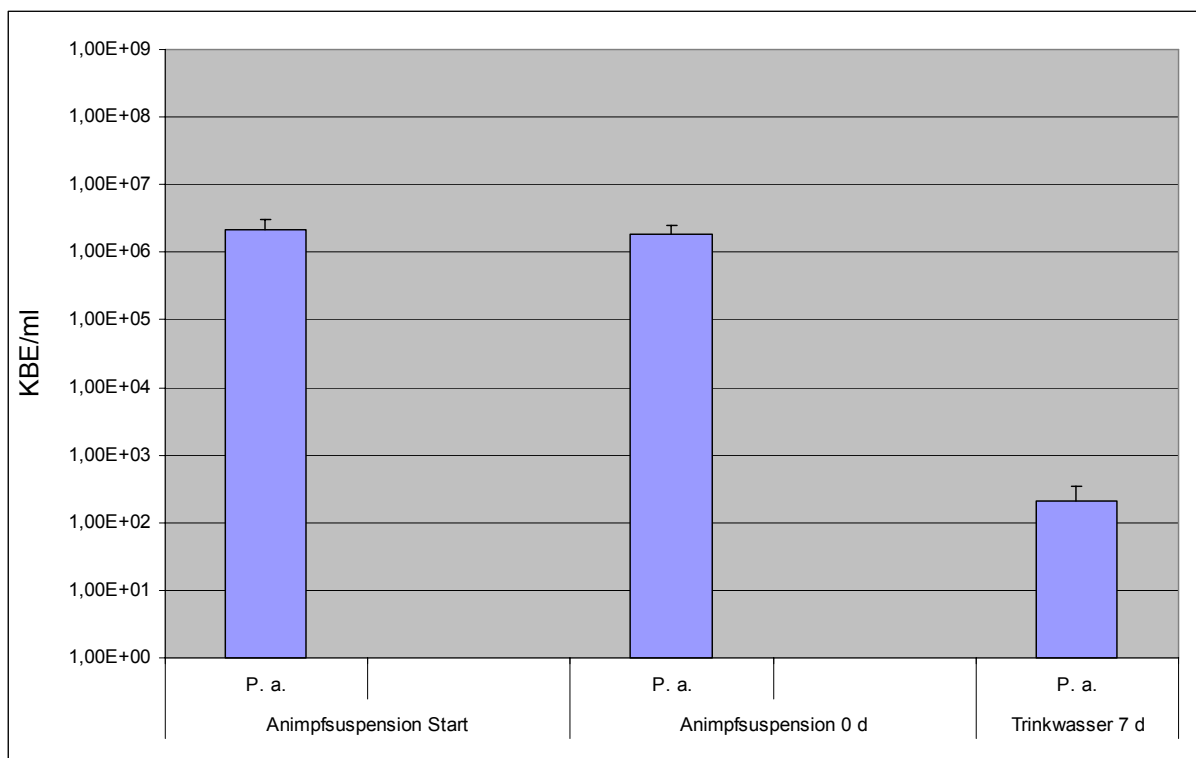
In Abb. 51 wurden die Ergebnisse der Biofilmuntersuchungen dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass die mittlere Gesamtzellzahl im Kontrollbiofilm bei ca.  $1 \times 10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup>, der HPC-Wert bei ca.  $5 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> lag. Somit waren ca. 50 % aller Zellen über den HPC nachweisbar.

Die mittlere Gesamtzellzahl des Biofilms nach der Einnistung (0 d) lag bei ca.  $7 \times 10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup>, der HPC-Wert bei ca.  $2 \times 10^8$  KBE/cm<sup>2</sup>. Somit waren ca. 30 % aller Zellen über den HPC nachweisbar. *P. aeruginosa* SG81 R1 war mit ca.  $1 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> nachweisbar. Dies entsprach ca. 0,15 % der Gesamtzellen oder ca. 0,5 % des HPC-Wertes.

Nach 7 Tagen im Trinkwasser lag die mittlere Gesamtzellzahl der Biofilme bei ca.  $2 \times 10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup> und der HPC-Wert bei ca.  $7 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup>. Somit waren ca. 35 % aller Zellen über den HPC nachweisbar. *P. aeruginosa* SG81 R1 war mit ca.  $3 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> nachweisbar. Dies entsprach ca. 0,15 % der Gesamtzellen oder ca. 0,5 % des HPC-Wertes. Die Koloniezahl von *P. aeruginosa* SG81 R1 entsprach noch ca. 30 % der Einnistungskonzentration (Koloniezahl von *P. aeruginosa* SG81 R1 nach der Einnistung). Die Gesamtzellzahlen und HPC-Werte der Biofilme bleiben über den Versuchszeitraum in vergleichbarer Größenordnung.

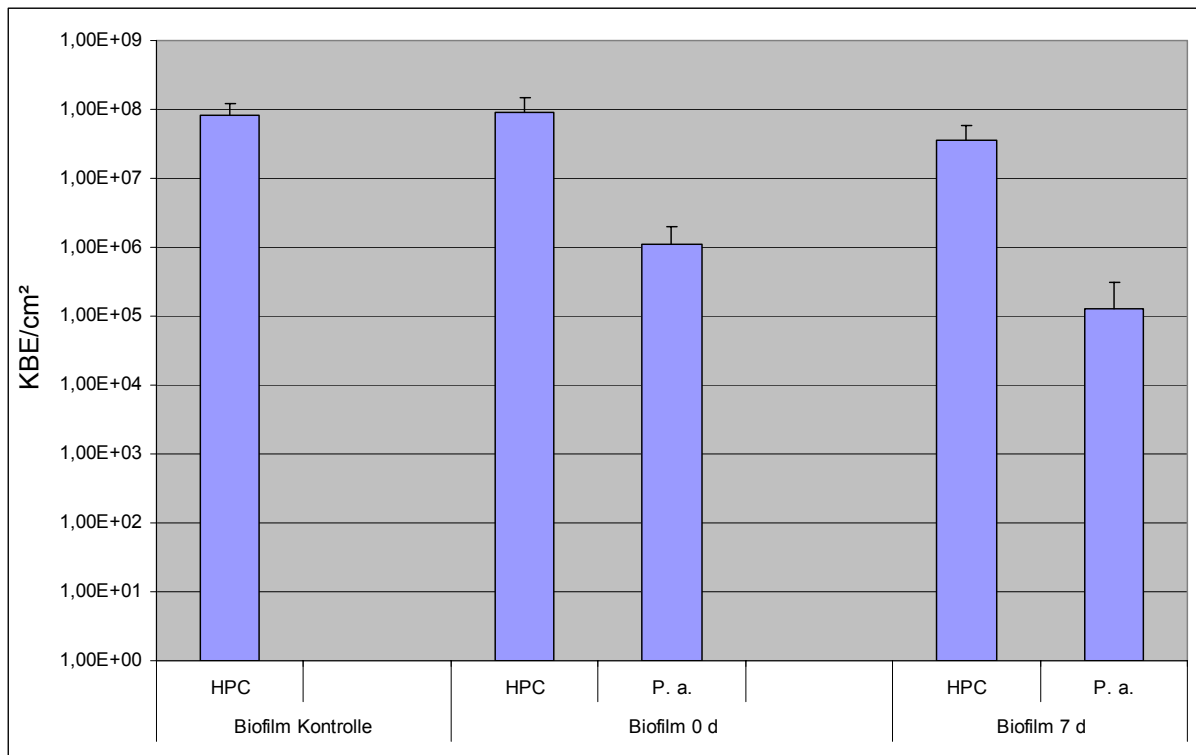
Die Ergebnisse ließen darauf schließen, dass *P. aeruginosa* SG81 R1 nach der Einnistung in den Biofilm deutlich besser gegen Trinkwasserinhaltsstoffe geschützt zu sein schien als in suspendierter Form. Nach 7 Tagen im Trinkwasser unter stagnierenden Bedingungen war *P. aeruginosa* im Biofilm (ca.  $10^5$  KBE/cm<sup>2</sup>) und auch in der Wasserphase noch nachweisbar. Wahrscheinlich kann dies aber nicht auf Resistenzausbildung gegen Wasserinhaltsstoffe zurückgeführt werden, sondern eher auf die Inaktivierung der schädlichen Stoffe.

Des Weiteren wurde in 2 unabhängigen Versuchen untersucht, wie sich der mucoide *P. aeruginosa* FRD1 nach Einnistung in Trinkwasserbiofilme verhielt. Um einen Trend in den Ergebnissen besser erkennen zu können, wurden die Mittelwerte berechnet (siehe Abb. 52 und 53).



**Abb. 52:** Untersuchung der wässrigen Phasen von Einnistungsexperimenten mit *P. aeruginosa* FRD1. Es wurde die Koloniezahl von *P. aeruginosa* (P. a.) auf CN-Agar pro ml in den Animpfsuspensionen und dem Trinkwasser nach 7 Tagen Inkubation bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (n = 2) angegeben. Aus technischen Gründen konnte in den Experimenten die Gesamtzellzahl nicht bestimmt werden.

Die mittlere Koloniezahl von *P. aeruginosa* FRD1 blieb während der Einnistung nahezu unverändert (siehe Abb. 52). In beiden Experimenten war im Trinkwasser nach 7 Tagen noch *P. aeruginosa* nachweisbar.



**Abb. 53:** Biofilme von Einnistungsexperimenten mit *P. aeruginosa* FRD1. Dieser wurde in Trinkwasserbiofilme eingenistet (0 d) und die Persistenz nach 7 Tagen Inkubation in Trinkwasser untersucht. Es wurde die Koloniezahl pro cm<sup>2</sup> auf R2A (HPC) und CN-Agar (P. a.) bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (Kontrollbiofilm n = 2, Biofilm 0 d n = 2, Biofilm 7 d n = 4) angegeben. Aus technischen Gründen konnte in den Experimenten die Gesamtzellzahl nicht bestimmt werden.

In Abb. 53 wurden die Ergebnisse der Untersuchungen der Biofilme dargestellt. Dabei ist erkennbar, dass der mittlere HPC-Wert des Kontrollbiofilms bei ca.  $8 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> lag.

Nach der Einnistung war kaum eine Änderung zu erkennen ( $9 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup>). *P. aeruginosa* FRD1 war mit  $1 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> nachweisbar. Dies entsprach ca. 1,1 % des HPC-Wertes. Bei der Entnahme der Biofilme lösten sich größere Bereiche des Biofilms.

Nach 7 Tagen in Trinkwasser lag der mittlere HPC-Wert bei  $3,6 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> und die Koloniezahl von *P. aeruginosa* FRD1 bei  $1,3 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup>. Somit lag der Anteil am HPC bei ca. 0,4 %. Im Mittel waren ca. 10 % der Einnistungskonzentration (Koloniezahl von *P. aeruginosa* FRD1 nach der Einnistung) von *P. aeruginosa* FRD1 noch nachweisbar.

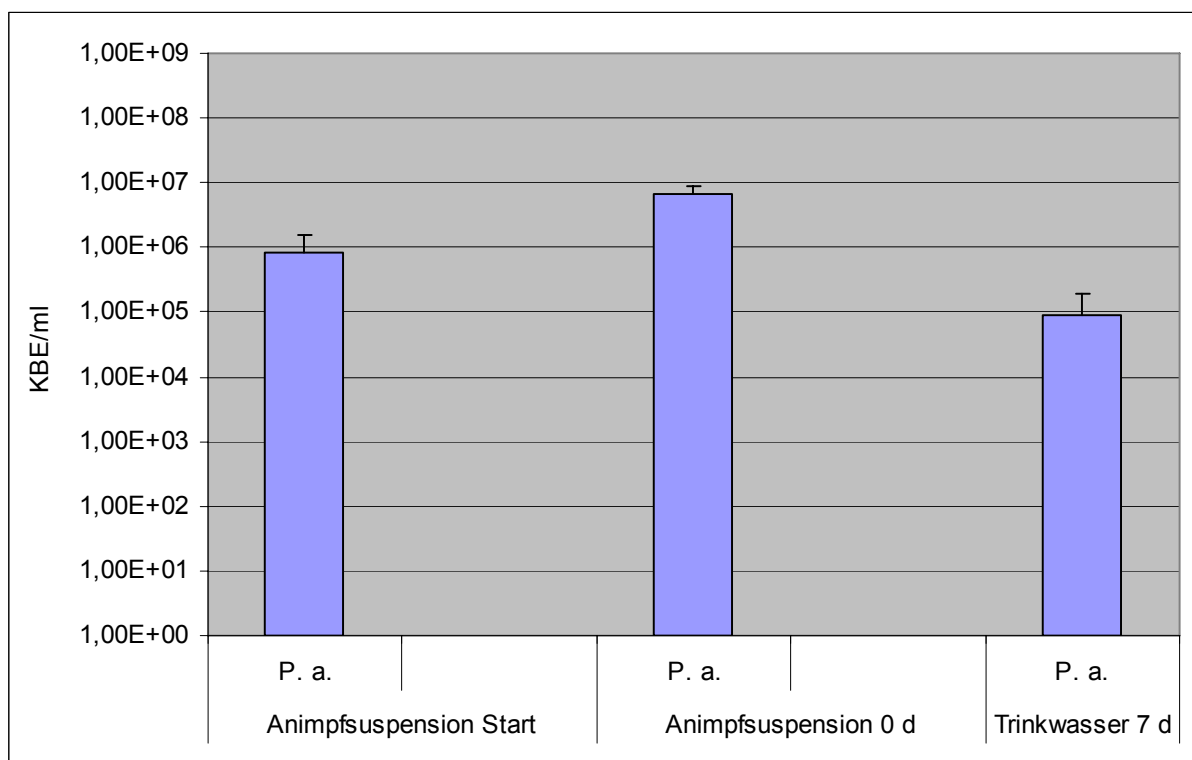
Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass nach der Einnistung in den Biofilm *P. aeruginosa* FRD1 deutlich besser gegen inaktivierende Trinkwasserinhaltsstoffe geschützt zu sein schien als in suspensierter Form. Nach 7 Tagen im Trinkwasser unter stagnierenden Bedingungen war *P. aeruginosa* im Biofilm (ca.  $10^5$  KBE/cm<sup>2</sup>)

und auch in der Wasserphase noch nachweisbar. Auch hier ist eine auf Resistenzausbildung unwahrscheinlich (s. o.).

Die bisherigen Untersuchungen zeigten bei den Biofilmen nach 7 Tagen in Trinkwasser (Ende des Versuchs), dass die Stämme im Vergleich mit dem Typ-Stamm DSM 50071 ähnliche Koloniezahlen von *P. aeruginosa* in den Biofilmen (ca.  $10^5$  KBE/cm<sup>2</sup>) innerhalb dieser Experimente aufwiesen. Unterschiede in der Biofilmstabilität direkt nach der Einnistung (0 d) konnten im Vergleich der mucoiden mit den nicht-mucoiden Stämmen beobachtet werden. Direkt nach der Einnistung der mucoiden Stämme (SG81 und FRD1) lösten sich bei der Entnahme der Coupons aus der Suspension größere Bereiche des Biofilms. Bei den anderen Stämmen (DSM 50071, SG81 R1) war dieses Phänomen nicht zu beobachten.

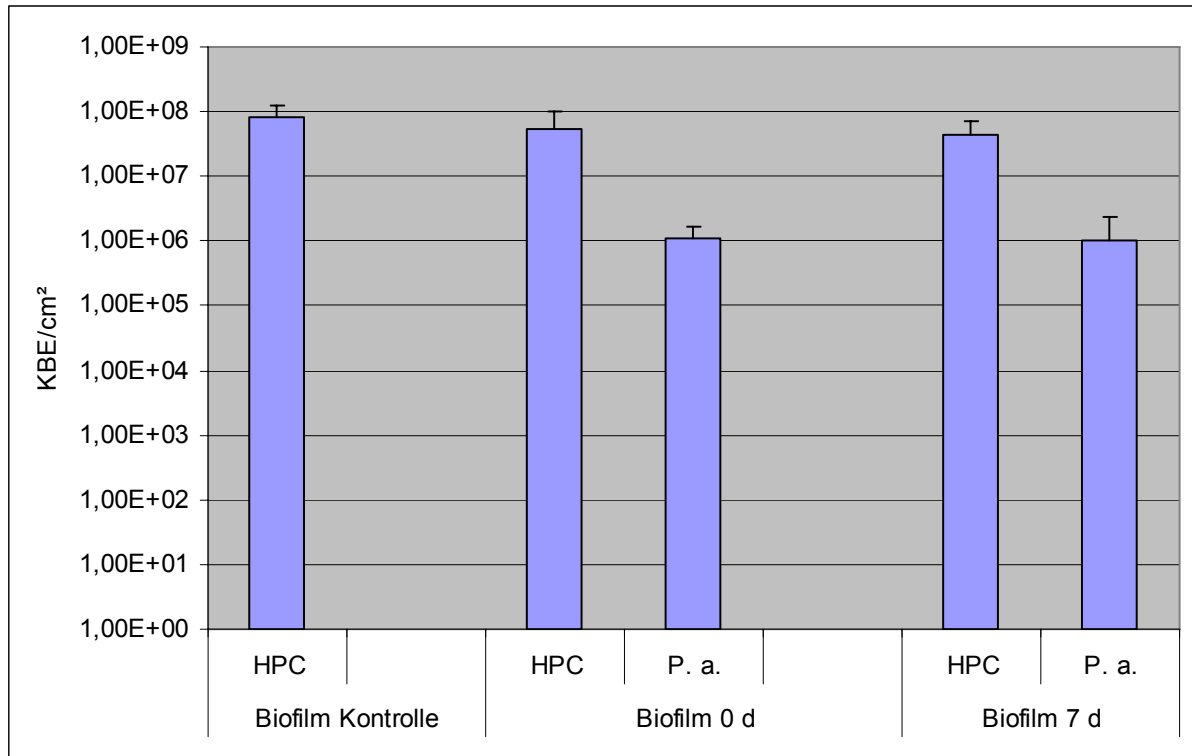
#### 4.2.3.6 Einnistung von *P. aeruginosa* PA14 in Trinkwasserbiofilme

In 2 unabhängigen Versuchen sollte untersucht werden, wie sich *P. aeruginosa* PA14 nach Einnistung in Trinkwasserbiofilme verhalten würde. Um einen Trend in den Ergebnissen besser erkennen zu können, wurden die Mittelwerte berechnet (siehe Abb. 54 und 55).



**Abb. 54:** Untersuchung der wässrigen Phasen von Einnistungsexperimenten mit *P. aeruginosa* PA14. Es wurde die Koloniezahl von *P. aeruginosa* (P. a.) auf CN-Agar pro ml in den Animpfsuspensionen und dem Trinkwasser nach 7 Tagen Inkubation bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (n = 2) angegeben. In den Experimenten konnte die Gesamtzellzahl nicht bestimmt werden.

Bei Betrachtung von Abb. 54 ist zu erkennen, dass die mittlere Koloniezahl von *P. aeruginosa* PA14 in der Start-Animpfsuspension bei ca.  $8 \times 10^5$  KBE/ml lag. Nach der Einnistung lag die mittlere Koloniezahl bei ca.  $7 \times 10^6$  KBE/ml. Somit erhöhte sich die Koloniezahl von *P. aeruginosa* PA14 um ca. 1 log-Stufe. In beiden Experimenten konnte *P. aeruginosa* PA14 nach 7 Tagen im Trinkwasser nachgewiesen werden.



**Abb. 55:** Biofilme von Einnistungsexperimenten mit *P. aeruginosa* PA14. Dieser wurde in Trinkwasserbiofilme eingenistet (0 d) und die Persistenz nach 7 Tagen Inkubation in Trinkwasser untersucht. Es wurde die Koloniezahl pro cm² auf R2A (HPC) und CN-Agar (P. a.) bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (Kontrollbiofilm n = 2, Biofilm 0 d n = 2, Biofilm 7 d n = 4) angegeben. In den Experimenten konnte die Gesamtzellzahl nicht bestimmt werden.

Wie aus den Biofilmuntersuchungen (siehe Abb. 55) ersichtlich ist, lag der mittlere HPC-Wert des Kontroll-Biofilms bei ca.  $8 \times 10^7$  KBE/cm².

Nach der Einnistung (0 d) war kaum eine Änderung zu erkennen ( $6 \times 10^7$  KBE/cm²). *P. aeruginosa* PA14 war mit  $1 \times 10^6$  KBE/cm² nachweisbar. Dies entsprach ca. 1,7 % des HPC-Wertes.

Nach 7 Tagen in Trinkwasser lag der mittlere HPC-Wert bei ca.  $4 \times 10^7$  KBE/cm² und die Koloniezahl von *P. aeruginosa* PA14 bei ca.  $1 \times 10^6$  KBE/cm². Somit lag der Anteil am HPC bei ca. 2,5 %. Es war keine Veränderung in der Koloniezahl von *P. aeruginosa* PA14 über 7 Tage in Trinkwasser zu erkennen.

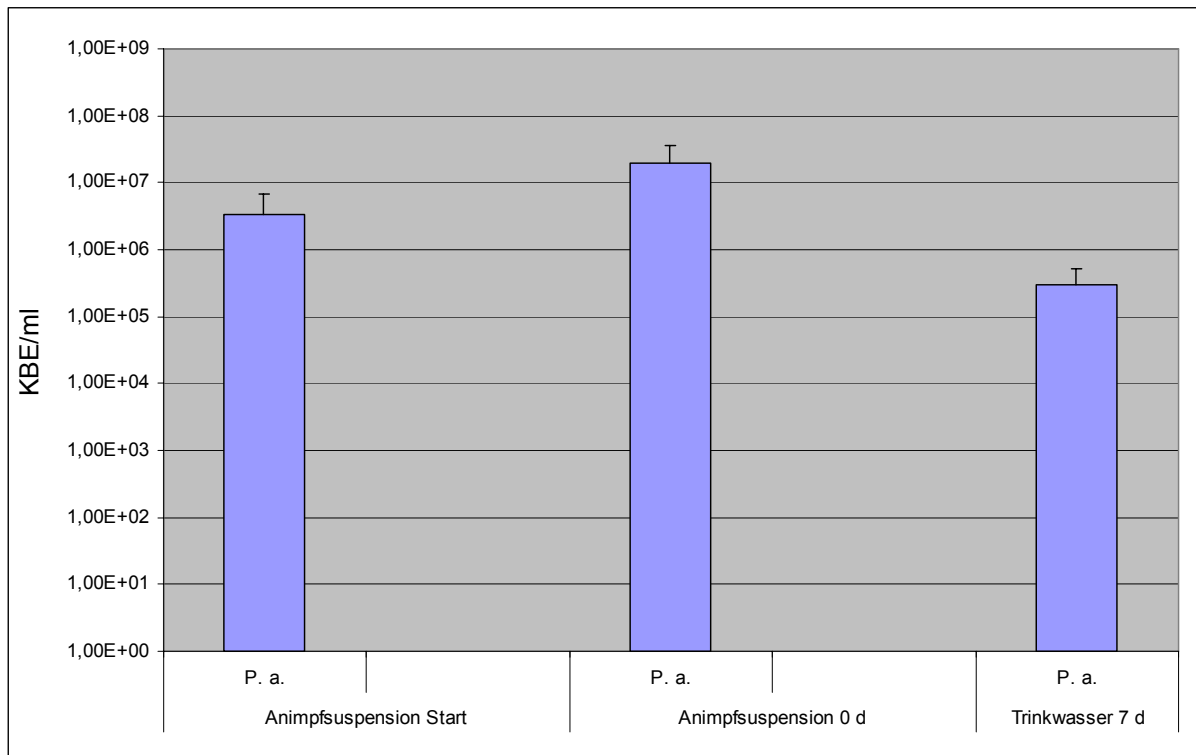
Anhand dieser Ergebnisse war erkennbar, dass nach der Einnistung in den Biofilm *P. aeruginosa* PA14 deutlich besser gegen inaktivierende Trinkwasserinhaltsstoffe geschützt zu sein schien als in suspendierter Form. Nach 7 Tagen im Trinkwasser unter stagnierenden Bedingungen war *P. aeruginosa* im Biofilm (ca.  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup>) und auch in der Wasserphase noch nachweisbar. Wahrscheinlich ist dies aber nicht auf Resistenzausbildung gegen Wasserinhaltsstoffe zurückzuführen, sondern eher auf die Inaktivierung der schädlichen Stoffe.

#### **4.2.3.7 Einfluss von Lektinen (LecA / LecB) auf die Einnistung in Trinkwasserbiofilme**

Um den Einfluss von Lektinen auf die Einnistung und Persistenz von *P. aeruginosa* PAO1 zu untersuchen, wurden der Stamm PAO1 sowie Lektin-Defekt-Mutanten von PAO1, die entweder das Lektin LecB oder die beiden Lektine LecA und LecB nicht produzieren konnten, in Trinkwasserbiofilme eingenistet. Es konnte davon ausgegangen werden, dass Bindestellen für das Lektin LecB in den Trinkwasserbiofilmen vorhanden waren (siehe 4.2.2). Sollten die Lektine für die Einnistung oder Persistenz notwendig sein, so müssten Unterschiede zwischen dem Stamm PAO1 und dessen Lektin-Defekt-Mutanten erkennbar sein.

Um einen direkten Vergleich von PAO1 und den Lektin-Defekt-Mutanten zu erhalten, wurden hauptsächlich Versuche mit allen 3 Teststämmen synchron durchgeführt. Aufgrund des Testsystems konnten dann je Versuch nur 2 Proben pro Stamm angesetzt werden.

In 4 unabhängigen Versuchen sollte untersucht werden, wie sich *P. aeruginosa* PAO1 nach Einnistung in Trinkwasserbiofilme verhielt. Um einen Trend in den Ergebnissen besser erkennen zu können, wurden die Mittelwerte berechnet (siehe Abb. 56 und 57).



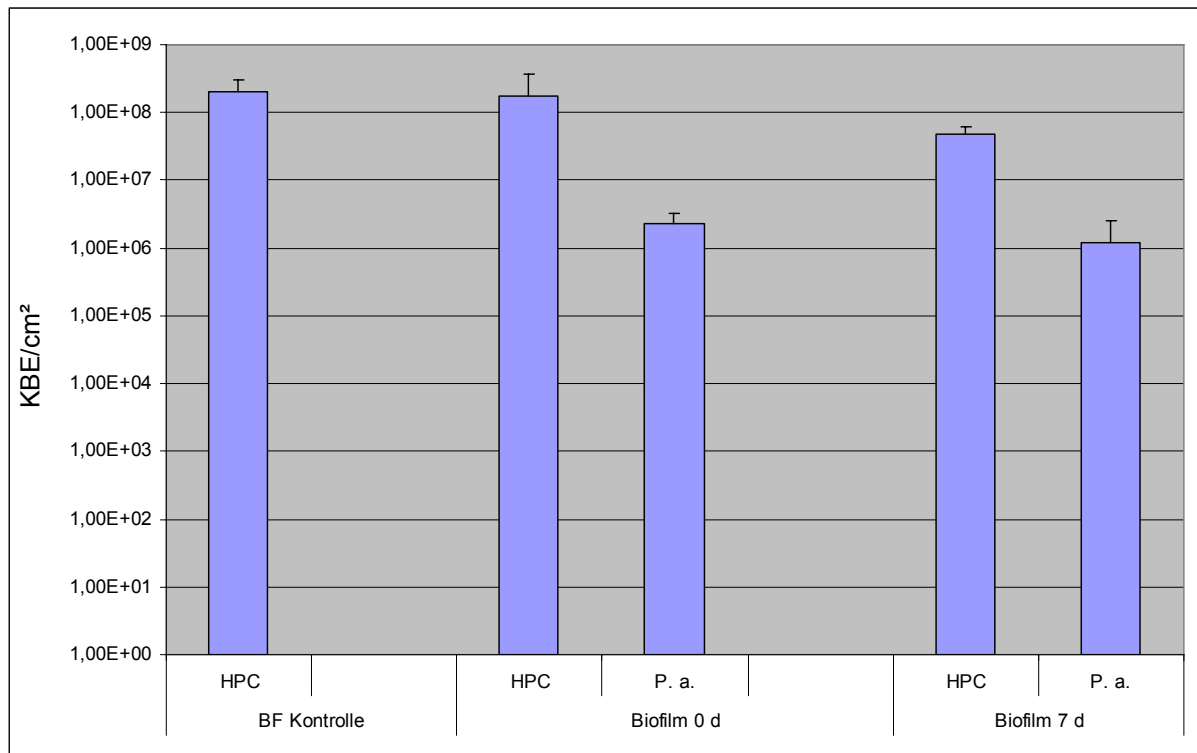
**Abb. 56:** Untersuchung der wässrigen Phasen von Einnistungsexperimenten mit *P. aeruginosa* PAO1. Es wurde die Koloniezahl von *P. aeruginosa* (P. a.) auf CN-Agar pro ml in den Animpfsuspensionen und dem Trinkwasser nach 7 Tagen Inkubation bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ( $n = 5$ ) angegeben (bei Trinkwasser 7 d abweichend  $n = 4$ ). In den Experimenten konnte die Gesamtzellzahl aus technischen Gründen nicht bestimmt werden.

Wie in Abb. 56 gezeigt, lag die mittlere Koloniezahl in der Start-Animpfsuspension von *P. aeruginosa* PAO1 auf CN-Agar bei ca.  $3 \times 10^6$  KBE/ml.

Nach der Einnistung waren ca.  $2 \times 10^7$  KBE/ml *P. aeruginosa* PAO1 auf CN-Agar nachweisbar. Die mittlere Koloniezahl in der Animpfsuspension hatte sich um ca. 1 log-Stufe erhöht.

Im Trinkwasser ließ sich nach 7 Tagen *P. aeruginosa* PAO1 im Bereich von ca.  $10^5$  KBE/ml nachweisen.





**Abb. 57:** Biofilme von Einnistungsexperimenten mit *P. aeruginosa* PAO1. Dieser wurde in Trinkwasserbiofilme eingenistet (0 d) und die Persistenz nach 7 Tagen Inkubation in Trinkwasser untersucht. Es wurde die Koloniezahl pro cm<sup>2</sup> auf R2A (HPC) und CN-Agar (P. a.) bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (Kontrollbiofilm n = 5, Biofilm 0 d n = 4, Biofilm 7 d n = 6) angegeben. In den Experimenten konnte die Gesamtzellzahl aus technischen Gründen nicht bestimmt werden.

Die Ergebnisse der Biofilmuntersuchungen wurden in Abb.57 dargestellt. Dabei war erkennbar, dass die mittlere Koloniezahl des HPC vom Kontroll-Biofilm bei ca.  $2 \times 10^8$  KBE/cm<sup>2</sup> lag.

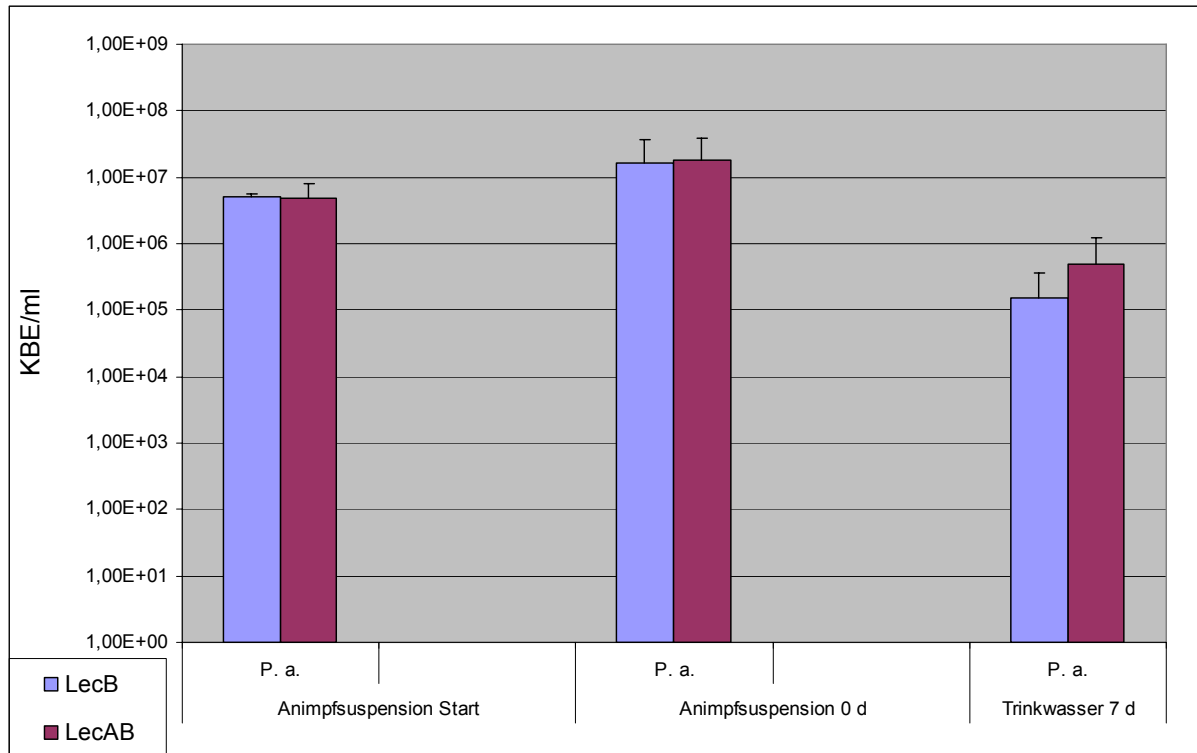
Nach der Einnistung waren es auch ca.  $2 \times 10^8$  KBE/cm<sup>2</sup>. *P. aeruginosa* PAO1 war in einer Größenordnung von ca.  $2 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> nachweisbar. Dies entsprach ca. 1 % des HPC-Mittelwertes.

Nach 7 Tagen im Trinkwasser lag der mittlere HPC-Wert bei ca.  $5 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup>, die Koloniezahl von *P. aeruginosa* PAO1 bei ca.  $1 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup>. Somit lag der Anteil von *P. aeruginosa* PAO1 am HPC bei ca. 2,5 %. Im Mittel waren ca. 50 % der Einnistungskonzentration (Koloniezahl von *P. aeruginosa* PAO1 nach der Einnistung) von *P. aeruginosa* PAO1 noch nachweisbar.

Anhand dieser Untersuchung zeigte sich, dass nach der Einnistung in den Biofilm *P. aeruginosa* PAO1 deutlich besser gegen inaktivierende Trinkwasserinhaltsstoffe geschützt zu sein schien als in suspenderter Form. Nach 7 Tagen im Trinkwasser unter stagnierenden Bedingungen war *P. aeruginosa* im Biofilm (ca.  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup>) und auch in der Wasserphase noch nachweisbar. Wahrscheinlich ist dies aber nicht

auf Resistenzausbildung gegen Wasserinhaltsstoffe zurückzuführen, sondern eher auf die Inaktivierung der schädlichen Stoffe.

Das Verhalten der Lektin-Defekt-Mutanten *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ LecB und  $\Delta$ LecA $\Delta$ LecB nach Einnistung in Trinkwasserbiofilme sollte in 4 unabhängigen Versuchen untersucht werden. Um einen Trend in den Ergebnissen besser erkennen zu können, wurden die Mittelwerte berechnet (siehe Abb. 58 und 59).

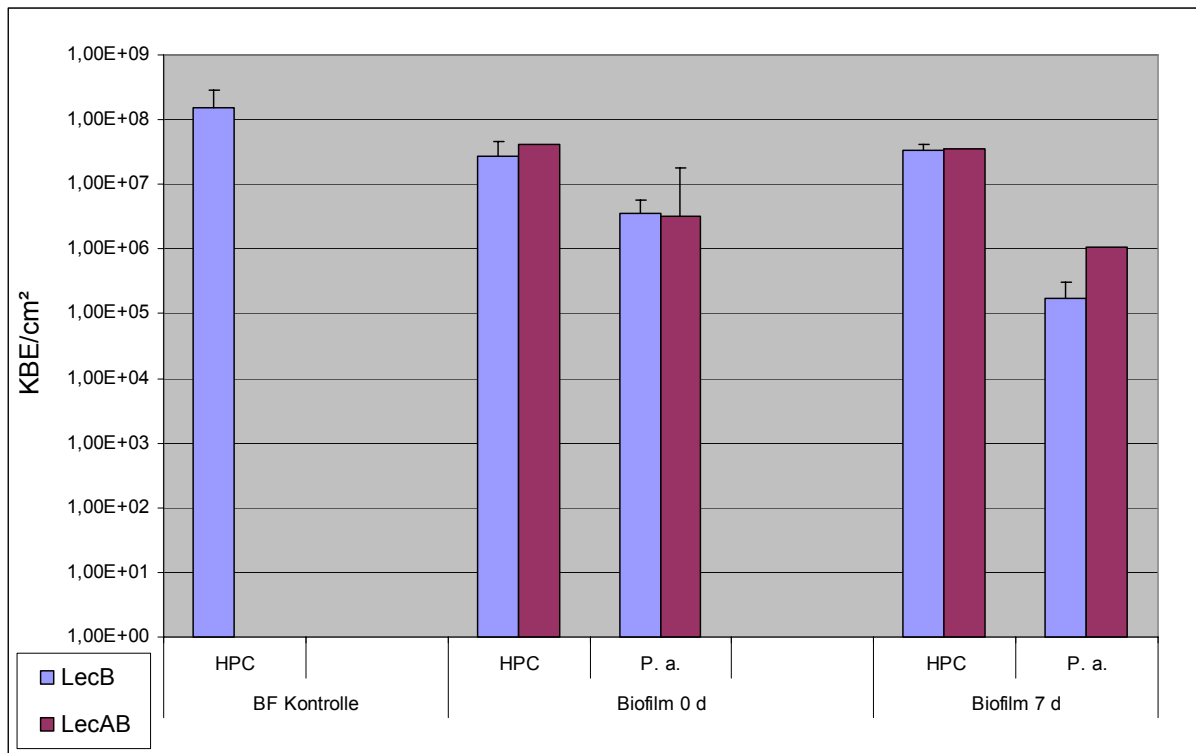


**Abb. 58:** Untersuchung der wässrigen Phasen von Einnistungsexperimenten mit *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ LecB und  $\Delta$ LecA $\Delta$ LecB. Es wurde die Koloniezahl von *P. aeruginosa* (*P. a.*) auf CN-Agar pro ml in den Animpfsuspensionen und dem Trinkwasser nach 7 Tagen Inkubation bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (Animpfsuspension  $n = 4$ , Trinkwasser  $n = 2$ ) angegeben. In den Experimenten konnte die Gesamtzellzahl aus technischen Gründen nicht bestimmt werden.

Anhand von Abb. 58 ist erkennbar, dass die mittlere Koloniezahl der Start-Animpfsuspension von *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ LecB und  $\Delta$ LecA $\Delta$ LecB auf CN-Agar bei ca.  $5 \times 10^6$  KBE/ml lag.

Nach der Einnistung waren von beiden Lektin-Defekt-Mutanten ca.  $2 \times 10^7$  KBE/ml auf CN-Agar nachweisbar. Somit hatte sich die Koloniezahl während der Einnistung nahezu vervierfacht.

Im Trinkwasser ließ sich nach 7 Tagen *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ LecB und  $\Delta$ LecA $\Delta$ LecB in beiden Experimenten nachweisen.



**Abb. 59:** Biofilme von Einnistungsexperimenten mit *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ LecB und  $\Delta$ LecA $\Delta$ LecB. Diese wurden in Trinkwasserbiofilme eingenistet (0 d) und die Persistenz nach 7 Tagen Inkubation in Trinkwasser untersucht. Es wurde die Koloniezahl pro cm<sup>2</sup> auf R2A (HPC) und CN-Agar (P. a.) bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (Kontrollbiofilm n = 4, Biofilm 0 d n = 5, Biofilm 7 d n = 4) angegeben. In den Experimenten konnte die Gesamtzellzahl aus technischen Gründen nicht bestimmt werden.

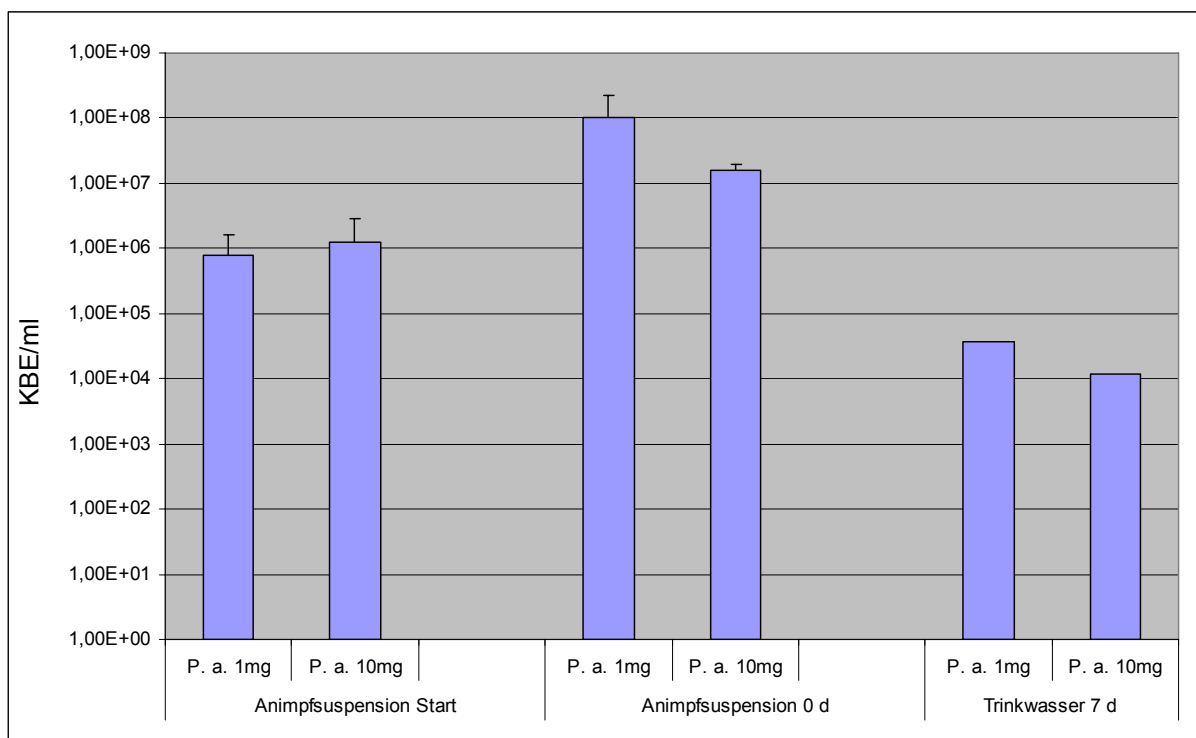
Die in Abb. 59 dargestellten Ergebnisse der Biofilmuntersuchungen zeigen, dass die mittlere Koloniezahl des HPC vom Kontroll-Biofilm bei ca.  $2 \times 10^8$  KBE/cm<sup>2</sup> lag.

Der mittlere HPC-Wert nach Einnistung lag bei dem  $\Delta$ LecB-Biofilm bei ca.  $3 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> und bei dem  $\Delta$ LecA $\Delta$ LecB-Biofilm bei  $4 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup>. *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ LecB war kulturell mit  $4 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> und  $\Delta$ LecA $\Delta$ LecB mit  $3 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> nachweisbar. Somit entsprach die Koloniezahl von *P. aeruginosa* bei  $\Delta$ LecB 13,3 % und für  $\Delta$ LecA $\Delta$ LecB 7,5 % des HPC-Wertes.

Nach 7 Tagen im Trinkwasser lag der mittlere HPC-Wert bei ca.  $3 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup>, die Koloniezahl von *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ LecB bei ca.  $2 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup>, von  $\Delta$ LecA $\Delta$ LecB bei  $1 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup>. Somit lag der Anteil von *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ LecB am HPC-Wert bei ca. 0,7 %, bei  $\Delta$ LecA $\Delta$ LecB bei ca. 3 %. Im Mittel waren ca. 5 % der Einnistungskonzentration (Koloniezahl von *P. aeruginosa* nach der Einnistung) von *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ LecB noch nachweisbar, bei  $\Delta$ LecA $\Delta$ LecB waren es ca. 30%.

Diese Ergebnisse zeigten, dass nach der Einnistung in den Biofilm *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta\text{LecB}$  und  $\Delta\text{LecA}\Delta\text{LecB}$  nach 7 Tagen im Trinkwasser unter stagnierenden Bedingungen mit ca.  $10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> nachweisbar war. Auch in der Wasserphase war er aufzufinden. Wahrscheinlich ist dies aber nicht auf Resistenzausbildung gegen Wasserinhaltsstoffe zurückzuführen, sondern eher auf die Inaktivierung der schädlichen Stoffe. Ein eindeutiger Unterschied zu dem PAO1 Stamm oder den anderen Stämmen (DSM 50071, PA14, SG81 R1, SG81 oder FRD1) war nicht erkennbar. Somit schienen die Lektine keine erkennbare Auswirkung auf das Einnistungs- oder Persistenzverhalten zu haben.

Ebenfalls sollte untersucht werden, ob Fucose, der Hemmzucker für das Lektin LecB, einen Einfluss auf die Einnistung von *P. aeruginosa* PAO1 haben würde. Es wurden 2 verschiedene Fucose-Konzentrationen (1 mg/ml und 10 mg/ml) verwendet. Tielker et al. 2005 zeigten, dass eine Mischung einer 100 mg/ml Fucose-Lösung mit einer 10  $\mu\text{g/ml}$  (LecB) Lektin-Lösung eine Lektinbindung an *P. aeruginosa*-Biofilme verhinderte. Um einen Trend in den Ergebnissen besser erkennen zu können, wurden die Mittelwerte berechnet (siehe Abb. 60 und 61).

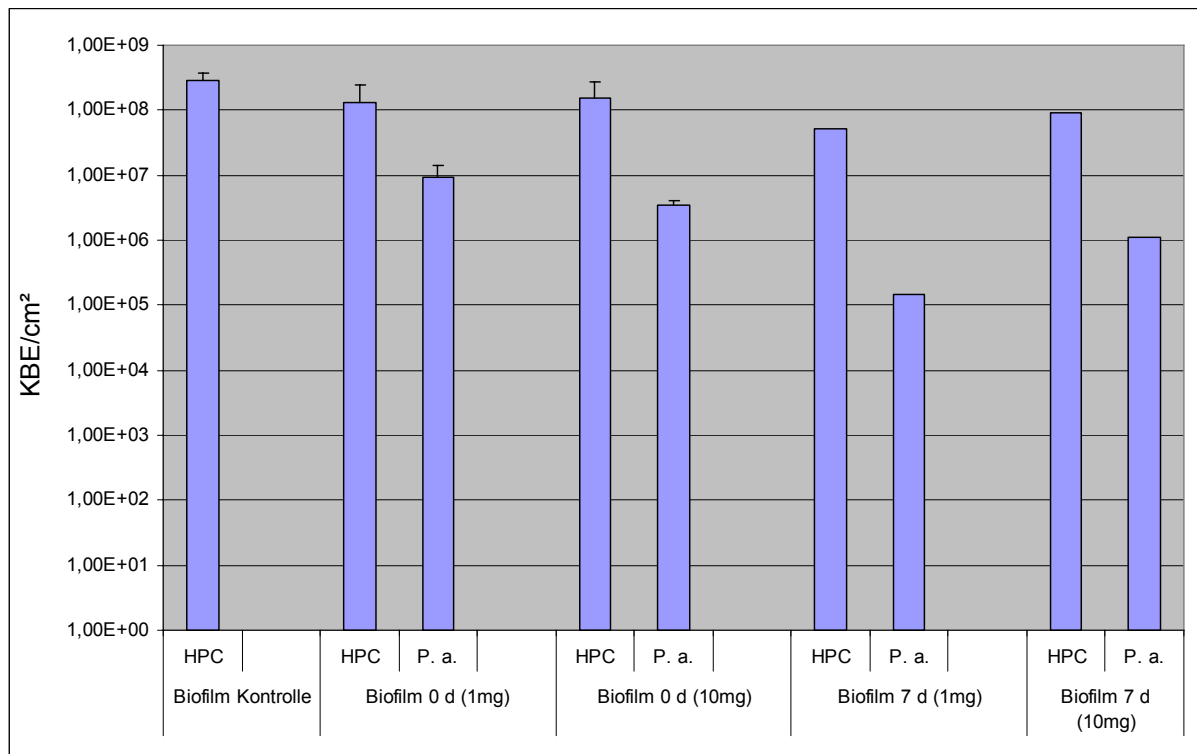


**Abb. 60:** Untersuchung der wässrigen Phasen von Einnistungsexperimenten mit *P. aeruginosa* PAO1, in Abhängigkeit von 2 verschiedenen Fucose-Konzentrationen (1 und 10 mg/ml). Es wurde die Koloniezahl von *P. aeruginosa* (P. a.) auf CN-Agar pro ml in den Animpfsuspensionen und dem Trinkwasser nach 7 Tagen Inkubation bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (n = 2) angegeben. Für Trinkwasser nach 7 Tagen wurde nur ein Wert dargestellt. In den beiden Experimenten konnte die Gesamtzellzahl nicht bestimmt werden.

In Abb. 60 ist erkennbar, dass die mittlere Koloniezahl in der Start-Animpfsuspension bei dem Ansatz mit 1 mg Fucose bei ca.  $8 \times 10^5$  KBE/ml und bei dem 10-mg-Ansatz bei ca.  $1 \times 10^6$  KBE/ml lag.

Nach der Einnistung lag die mittlere Koloniezahl des 1-mg-Ansatzes bei ca.  $1 \times 10^8$  KBE/ml und die des 10-mg-Ansatzes bei ca.  $2 \times 10^7$  KBE/ml. Somit war eine Erhöhung der Koloniezahl um mindestens 1 log-Stufe erkennbar.

In nur einem Experiment wurde das Trinkwasser nach 7 Tagen untersucht und hier konnte *P. aeruginosa* nachgewiesen werden.



**Abb. 61:** Biofilme von Einnistungsexperimenten mit *P. aeruginosa* PAO1. Dieser wurde in Trinkwasserbiofilme eingenistet und die Persistenz nach 7 Tagen Inkubation in Trinkwasser, in Abhängigkeit von 2 verschiedenen Fucose-Konzentrationen (1 und 10 mg/ml), untersucht. Es wurde die Koloniezahl pro cm<sup>2</sup> auf R2A (HPC) und CN-Agar (P. a.) bestimmt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (Kontrollbiofilm n = 2, Biofilm 0 d (1 mg) n = 4, Biofilm 0 d (10 mg) n = 3) angegeben. Bei den Werten der Biofilme 7 d handelte es sich um Einzelergebnisse. In den beiden Experimenten konnte die Gesamtzellzahl nicht bestimmt werden.

Abb. 61 zeigt die Ergebnisse der Biofilmuntersuchungen. Dabei ist erkennbar, dass der mittlere HPC-Wert des Kontrollbiofilms bei ca.  $3 \times 10^8$  KBE/cm<sup>2</sup> lag. Nach der Einnistung waren ca.  $1 \times 10^8$  KBE/cm<sup>2</sup> nachweisbar. Bei dem 1-mg-Ansatz lag die Koloniezahl von *P. aeruginosa* PAO1 bei ca.  $9 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> und bei dem 10-mg-Ansatz bei ca.  $4 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup>. Der Anteil von *P. aeruginosa* am HPC-Wert lag bei dem 1-mg-Ansatz bei ca. 9 % und bei dem 10-mg-Ansatz bei ca. 4 %.

Nach 7 Tagen im Trinkwasser lag der mittlere HPC-Wert im 1-mg-Ansatz bei ca.  $5 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup>, im 10-mg-Ansatz bei ca.  $9 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup>. Die Koloniezahl von *P. aeruginosa* PAO1 im 1-mg-Ansatz lag bei ca.  $2 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup>, im 10-mg-Ansatz bei ca.  $1 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup>. Somit lag der Anteil von *P. aeruginosa* am HPC im 1-mg-Ansatz bei ca. 0,2 % und im 10-mg-Ansatz bei 1,1 %. Im Mittel waren ca. 2 % der Einnistungskonzentration (Koloniezahl von *P. aeruginosa* nach der Einnistung) von *P. aeruginosa* PAO1 im 1-mg-Ansatz noch nachweisbar, bei dem 10-mg-Ansatz waren es ca. 25%.

Diese Untersuchung ließ erkennen, dass der Hemmzucker Fucose in Konzentrationen von 1 mg/ml und 10 mg/ml keinen erkennbaren Einfluss auf die Einnistung oder Persistenz von *P. aeruginosa* PAO1 hatte. Es konnten ähnliche Koloniezahlen von *P. aeruginosa* in den Biofilmen nach der Einnistung (ca.  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup>) und 7 d in Trinkwasser (ca.  $10^5$  KBE/cm<sup>2</sup>) gefunden werden wie bei den anderen Stämmen (s. o.)

#### 4.2.3.8 Vergleich der Stämme untereinander

Es wurden verschiedene *P. aeruginosa*-Stämme auf Unterschiede in ihrem Einnistungs- oder Persistenzverhalten in Trinkwasserbiofilmen untersucht. Als Bezugspunkte könnte die Gesamtzellzahl (GZZ) oder der HPC-Wert im Verhältnis zu *P. aeruginosa* dienen. Bei der Bestimmung dieser Parameter konnten aber Komplikationen auftreten. Bei den mucoiden Stämmen waren großflächige Ablösungen des Biofilms zu beobachten. Die nicht-mucoiden Stämme beeinflussten die HPC-Bestimmung und die Gesamtzellzahl konnte aus technischen Gründen nicht bei allen Versuchen bestimmt werden. Somit war eine eindeutige Aussage über die Verhältnisse dieser Parameter zueinander (z. B.: Animpfsuspension zu HPC-Wert des Biofilms oder Gesamtzellzahl im Biofilm oder Koloniezahl *P. aeruginosa* im Biofilm) nicht möglich. Daher wurde die flächenbezogene Koloniezahl von *P. aeruginosa* verwendet.

Bei der Betrachtung der Koloniezahlen von *P. aeruginosa* in den Biofilmen bezogen auf die Fläche, war kein eindeutigen Unterschied zwischen den Stämmen bezüglich der Einnistung oder Persistenz in Trinkwasserbiofilmen zu erkennen. Nach der Einnistung wurde *P. aeruginosa* in einer Größenordnung von ca.  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> nachgewiesen, nach 7 Tagen in Trinkwasser mit ca.  $10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> (siehe Tabelle 9). Wurde aber dennoch das Verhältnis des HPC zu *P. aeruginosa* im Biofilm betrachtet war erkennbar, dass *P. aeruginosa* PAO1 (PAO1, Lektin-Defekt-Mutanten und Fucose-Versuche) einen höheren Anteil an *P. aeruginosa* im Biofilm aufwies als die anderen Stämme. Das Verhältnis lag im ein bis zweistelligen Prozentbereich. Hierbei wurden 20 Biofilme berücksichtigt. Auch nach 7 Tagen in Trinkwasser waren PAO1 noch mindestens im Promillebereich nachweisbar.

Die anderen Stämme ließen sich meistens im Prozent- bis Promillebereich nach der Einnistung nachweisen. Nach 7 Tagen in Trinkwasser lagen die Verhältnisswerte

meistens im Bereich 1:1000 bis 1: 10.000. Berücksichtigte man allerdings das Verhältnis *P. aeruginosa* nach der Einnistung zum HPC-Wert des Biofilms (siehe Tabelle 9) zeigte sich, dass bei POA1 in den meisten Experimenten der HPC-Wert des Biofilms niedriger war, als bei den anderen Stämmen. Somit ist auch bei dieser Betrachtungsweise kein eindeutiger Unterschied zwischen den *P. aeruginosa*-Stämmen erkennbar.

**Tabelle 9:** Anteil von *P. aeruginosa* am HPC der Biofilme (BF), nach der Einnistung (0 d) und nach 7 Tagen in Trinkwasser

Stamm	Probe	HPC im BF [KBE/cm <sup>2</sup> ]	<i>P. aeruginosa</i> im BF [KBE/cm <sup>2</sup> ]	Anteil <i>P. aeruginosa</i> am HPC
DSM 50071	0 d	~ 10 <sup>8</sup>	~ 10 <sup>6</sup>	~ 3,0 %
	7 d	~ 10 <sup>8</sup>	~ 10 <sup>5</sup>	~ 0,5 %
SG81	0 d	~ 10 <sup>8</sup>	~ 10 <sup>5</sup>	~ 0,4 %
	7 d	~ 10 <sup>8</sup>	~ 10 <sup>5</sup>	~ 0,2 %
SG81 R1	0 d	~ 10 <sup>8</sup>	~ 10 <sup>6</sup>	~ 0,5 %
	7 d	~ 10 <sup>8</sup>	~ 10 <sup>5</sup>	~ 0,5 %
FRD1	0 d	~ 10 <sup>8</sup>	~ 10 <sup>6</sup>	~ 1,1 %
	7 d	~ 10 <sup>7</sup>	~ 10 <sup>5</sup>	~ 0,4 %
PA14	0 d	~ 10 <sup>8</sup>	~ 10 <sup>6</sup>	~ 1,7 %
	7 d	~ 10 <sup>7</sup>	~ 10 <sup>6</sup>	~ 2,5 %
PAO1	0 d	~ 10 <sup>8</sup>	~ 10 <sup>6</sup>	~ 1,0 %
	7 d	~ 10 <sup>7</sup>	~ 10 <sup>6</sup>	~ 2,5 %
ΔLecB	0 d	~ 10 <sup>7</sup>	~ 10 <sup>6</sup>	~ 13,3 %
	7 d	~ 10 <sup>7</sup>	~ 10 <sup>5</sup>	~ 0,7 %
ΔLecA- ΔLecB	0 d	~ 10 <sup>7</sup>	~ 10 <sup>6</sup>	~ 7,5 %
	7 d	~ 10 <sup>7</sup>	~ 10 <sup>6</sup>	~ 3,0 %
1 mg Fucose	0 d	~ 10 <sup>8</sup>	~ 10 <sup>7</sup>	~ 9,0 %
	7 d	~ 10 <sup>7</sup>	~ 10 <sup>5</sup>	~ 0,2 %
10 mg Fucose	0 d	~ 10 <sup>8</sup>	~ 10 <sup>6</sup>	~ 4,0 %
	7 d	~ 10 <sup>8</sup>	~ 10 <sup>6</sup>	~ 1,1 %

Auch wenn die flächenbezogenen Koloniezahlen von *P. aeruginosa* keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen aufzeigten, konnten dennoch Hinweise auf Einflussfaktoren bezüglich der Einnistung beobachtet werden. Bei den Untersuchungen mit dem nicht-mucoiden Stamm DSM 50071 wurden innerhalb von 3 Experimenten Unterschiede beobachtet. Die Biofilme nach der Einnistung (Biofilm 0 d) wiesen ähnliche GZZ- und HPC-Werte auf, allerdings unterscheiden sich die Koloniezahlen von *P. aeruginosa* in den Animpfsuspensionen. Nach der Einnistung ließ sich in einem Experiment *P. aeruginosa* bei einer Koloniezahl von ca.  $3 \times 10^5$  KBE/ml in der Animpfsuspension mit ca.  $4 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> im Biofilm nachweisen. Hierbei war eine Verringerung der Koloniezahl von *P. aeruginosa* in der Animpfsuspension (von  $5 \times 10^5$  auf  $3 \times 10^5$  KBE/ml) während der Einnistungsphase zu erkennen. Bei einem anderen Experiment lag die Koloniezahl in der Animpfsuspension bei ca.  $4 \times 10^6$  KBE/ml und die Koloniezahl im Biofilm bei ca.  $1 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup>. In einem weiteren Experiment waren ca.  $3 \times 10^6$  KBE/ml in der Animpfsuspension und in einem ähnlichen Bereich ( $2$  bzw.  $9 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup>) auch die Koloniezahlen im Biofilm aufzufinden. In diesen beiden Versuchen waren höhere Koloniezahlen von *P. aeruginosa* (ca. 1 log-Stufe) in der Animpfsuspension nach der Einnistungsphase zu beobachten. Wahrscheinlich sind nicht nur die Konzentration von *P. aeruginosa* in der Animpfsuspension oder der physiologische Zustand die einzigen Faktoren die das Einnistungsverhalten beeinflussen. Indiz hierfür war die geringere Konzentration von *P. aeruginosa* im Biofilm (ca.  $1 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup>) nach der Einnistung trotz Zunahme der Koloniezahl in der Animpfsuspension um ca. 1 log-Stufe. Nach 7 Tagen in Trinkwasser wiesen die Biofilme vergleichbare GZZ-, HPC-Werte und Koloniezahlen von *P. aeruginosa* auf.

Bei dem mucoiden Stamm SG81 konnte beobachtet werden, dass eine Konzentration an *P. aeruginosa* von ca.  $5 \times 10^6$  KBE/ml (Animpfsuspension 0 d) in einem Fall zu einer Koloniezahl von ca.  $10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> im Biofilm führte, in einem anderen Fall zu einer von ca.  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> bei ähnlichen GZZ- und HPC-Werten. Dies könnte, ähnlich wie bei DSM 50071, ein Hinweis auf weitere Einflussfaktoren bei der Einnistung sein.

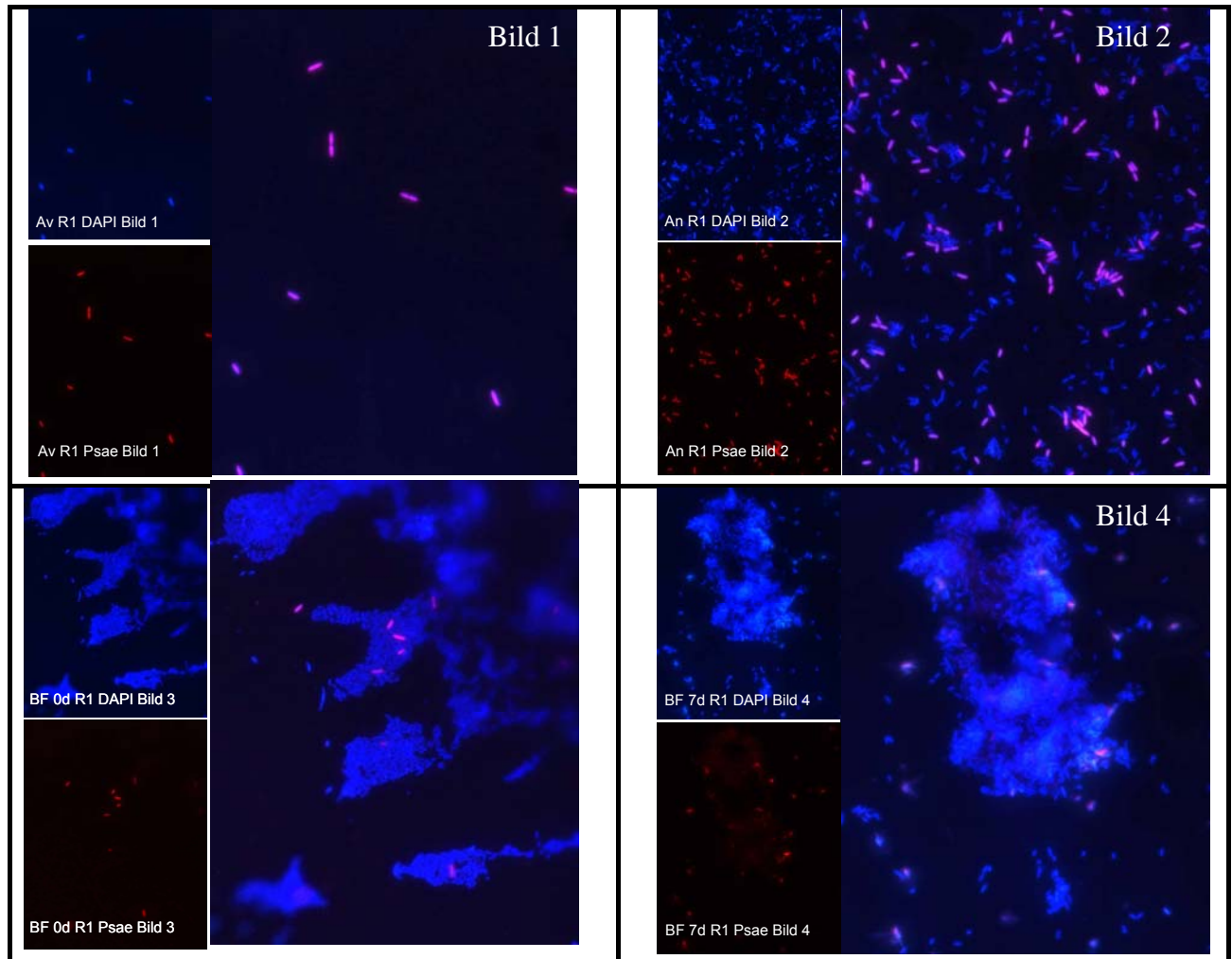
Untersuchungen mit dem nicht-mucoiden Stamm SG81 R1 zeigten, dass obwohl sich die Konzentration von *P. aeruginosa* in den Animpfsuspensionen unterschied (ca. 35-mal höhere Koloniezahl am Ende der Einnistung), waren in den Biofilmen vergleichbare Koloniezahlen und ähnliche Verhältnisse nachweisbar. Wie bei den Stämmen DSM 50071 und SG81 könnte dies ein Hinweis auf weitere Einflussfaktoren als nur die Konzentration von *P. aeruginosa* bei der Einnistung sein.



#### 4.2.3.9 Visualisierung von *P. aeruginosa* mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die FISH bietet eine Möglichkeit, Bakterien anhand von Sonden (fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide) zu identifizieren (siehe 1.5.2). Um verwertbare Ergebnisse zu erhalten, muss die FISH-Methode etabliert werden. Dies wurde für *P. aeruginosa* durchgeführt. Dabei können unterschiedliche Proben (Suspensionen, Biofilmen) verwendet werden. Um Suspensionen zu untersuchen ist es möglich, die FISH auf Objektträgern (siehe 3.3.5.1) durchzuführen (z. B.: Kempf et al. 2000). Dazu wurden zuerst 2 verschiedene Sonden (Psae und Psae 16S-182) für *P. aeruginosa* getestet (siehe 2.2). Beide Sonden stellten sich für die Anwendung bei Reinkulturen als geeignet dar. Dies wurde anhand der *P. aeruginosa*-Stämmen DSM 50071, PA14, PAO1, FRD1, SG81 und SG81 R1 überprüft. Wurde *P. aeruginosa* mit Trinkwasserbiofilmen vermischt, zeigte sich, dass die Psae-16S-182-Sonde besser (stärkeres Fluoreszenzsignal) für die Identifizierung in Mischkulturproben geeignet war als die Psae-Sonde. Hierfür wurde *P. aeruginosa* vorher auf Agar-Medium angezüchtet und dann mit Trinkwasserbiofilmsuspensionen vermischt. Es wurden alle verwendeten *P. aeruginosa*-Stämme bis auf die Lektin-Defekt-Mutanten getestet. Als Negativkontrolle für die FISH-Prozedur wurde die NonEUB338-Sonde, als Positivkontrolle die EUB338-Sonde verwendet.

Im nächsten Schritt wurde versucht, *P. aeruginosa* im Verlauf der Einnistungsexperimente in Biofilmsuspensionen nachzuweisen. Dafür wurden Proben von der Start-Animpfsuspension (Av), von der Animpfsuspension nach der Einnistung (An), vom Biofilm nach der Einnistung (BF 0 d) und vom Biofilm nach 7 Tagen in Trinkwasser (BF 7 d) untersucht. Beispielhaft wurde dies an einer Probenserie von *P. aeruginosa* SG81 R1 dargestellt (siehe Abb. 62).



**Abb. 62:** FISH an Biofilmsuspensionen. Je Bildgruppe wurde jeweils links oben das Bild mit einer Gesamtzell-Färbung (DAPI), links unten das Bild der Psae-16S-182-Sonden-Färbung (in den Bildern als Psae bezeichnet) und dann das resultierende Bild in groß dargestellt. Es handelt sich um Aufnahmen bei 1000-facher Vergrößerung. Dargestellt wurde die Start-Animpfsuspension (Av, Bild 1), die Animpfsuspension nach der Einnistung (An, Bild 2), eine Biofilmprobe nach der Einnistung (BF 0 d, Bild 3) und eine Biofilmprobe nach 7 Tagen in Trinkwasser (BF 7 d, Bild 4).

Es ließen sich ähnliche Verhältnisse (sondenpositive Zellen zur Gesamtzell-Färbung) wie mit Gesamtzellzahl und Koloniezahl erkennen. In Stichproben waren bei der Start-Animpfsuspension nahezu alle Zellen mit den Sonden wiederzufinden. In der Animpfsuspension nach der Einnistung lag das Verhältnis im Prozentbereich, in den Biofilmen etwas darunter. In den Biofilmen, hauptsächlich nach 7 Tagen in

Trinkwasser, waren FISH-positive Zellen eher in Flocken nachzuweisen. Hier lag ein Verhältnis von schätzungsweise 1000:1 bis 10000:1 Gesamtzellen zu FISH-positiven Zellen vor.

Da aber auf den Objektträgern, methodenbedingt, nicht direkt quantifiziert werden konnte, sondern bestenfalls Werte relativ zur Gesamtzellzahl erhalten werden konnten, wurde versucht eine Methode zu etablieren, die eine direkte Quantifizierung erlauben würde. Hierzu sollten die Proben auf Filter filtriert werden und anschließend die FISH-Prozedur auf den Filtern durchgeführt werden (siehe 3.3.5.3). Idealerweise hätten sich so Gesamtzellzahl und FISH-Quantifizierung in Einem ergeben. Allerdings stellte sich heraus, dass es kaum möglich war, die Zellen während der FISH-Prozedur auf der Filteroberfläche zu fixieren. Auch eine Hitzebehandlung der Zellen bei 80 °C auf den Filtern brachte keinen Erfolg. Versuche, die Fixierung für die FISH-Prozedur (siehe 3.3.5.1) direkt in der Suspension durchzuführen und anschließend zu filtrieren, zeigten ebenfalls kein zufriedenstellendes Ergebnis. Eine Aggregation der Zellen konnte nicht ausgeschlossen werden. Prinzipiell war die FISH-Prozedur aber auf Filtern durchführbar. Ein weiteres Problem zeigte sich anhand schwacher Sondensignale. Diese konnten durch Verlagerung des "Absorbant Pads" unter den Gittereinsatz (kein direkter Kontakt des "Absorbant Pads" mehr zum Filter) weitestgehend vermieden werden (siehe 3.3.5.3). Als vorteilhaft erwies es sich auch, die flüssigen Phasen während der FISH-Prozedur abzusaugen und nicht aus dem Hybridisierungsreaktor zu drücken. Hierdurch wurde die Bewegung des Reaktors weitestgehend reduziert.

Um *P. aeruginosa* direkt in Biofilmen nachweisen zu können, musste die Methode für die Suspensionen leicht modifiziert werden. Nach 90 min Hybridisierung konnten, wenn überhaupt, nur sehr schwache Sondensignale in den Biofilmen beobachtet werden. Wurde die Hybridisierungsdauer auf 3 Stunden erhöht, ließ sich *P. aeruginosa* nachweisen. Bei Biofilmen, die mit 96 %igem Ethanol total dehydratisiert wurden, waren in der Gesamtzell-Gegenfärbung nur selten einzelne Zellen erkennbar. Ebenfalls verlor der Biofilm deutlich an Volumen (vgl. Abb. 64 und 65). Ohne eine ethanolische Behandlung des Biofilms konnte auch nach 22 Stunden Hybridisierung kein Sonden-Signal erkannt werden. Wurde aber der Biofilm mit einer 1:1-Mischung aus Ethanol und PBS-Puffer behandelt und anschließend sofort hybridisiert, war *P. aeruginosa* nachweisbar. Kontrollversuche mit der NonEUB338-Sonde zeigten zwar eine diffuse Fluoreszenz, aber es konnten keine zellartigen Strukturen dabei erkannt werden. Färbungen mit der EUB338-Sonde waren mit denen der Gesamtzell-Färbungen vergleichbar. Nach der Einnistung war in den Biofilmen *P. aeruginosa* mit der FISH-Technik nachweisbar (siehe Abb. 63).

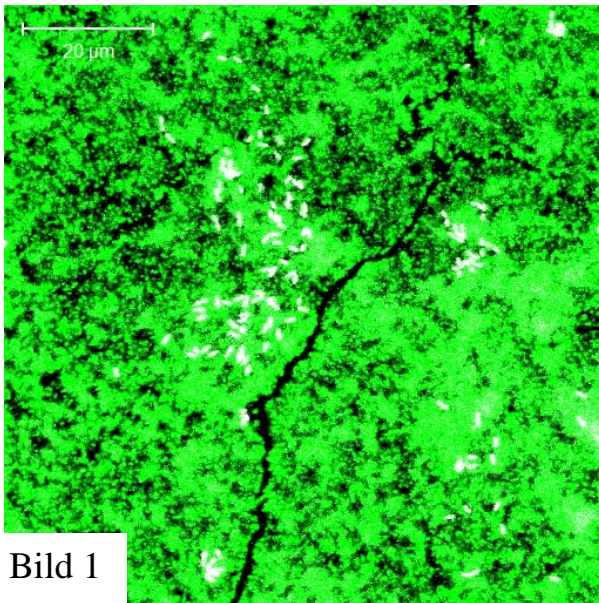


Bild 1

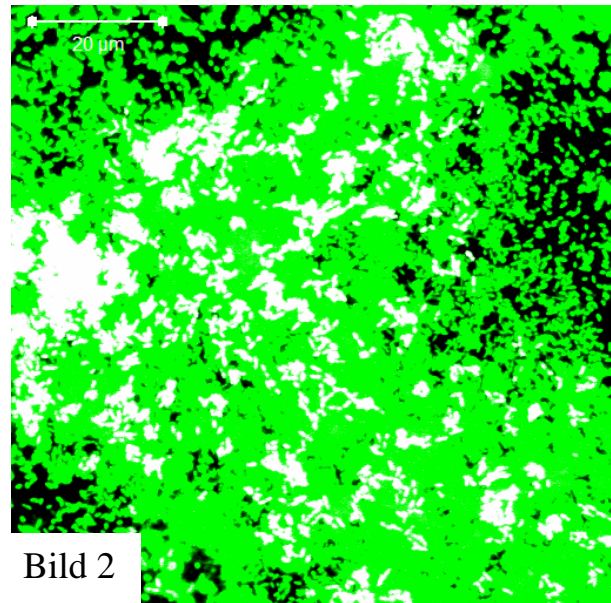


Bild 2

**Abb. 63:** FISH bei einem Biofilm nach Einnistung von *P. aeruginosa* DSM 50071. Die Gesamtzell-Färbung wurde grün und die Sonden-Färbung weiß dargestellt. Bild 1 und 2 sind Aufnahmen desselben Biofilms nur an unterschiedlichen Positionen. Es handelt sich um Aufnahmen bei 1000 Facher Vergrößerung.

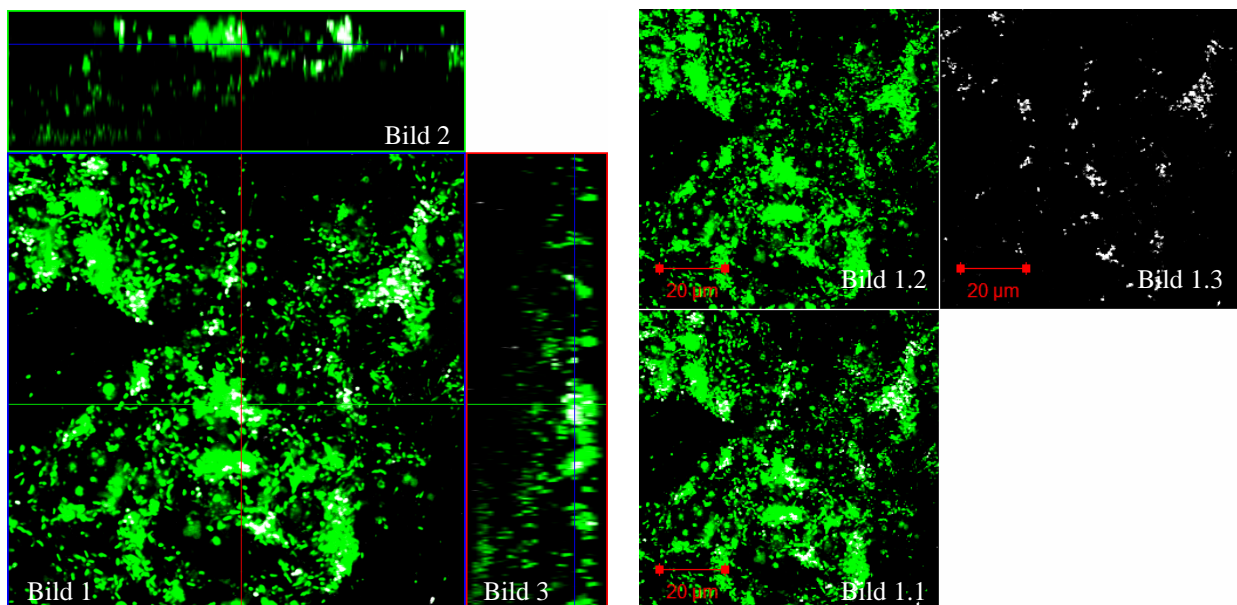
Bei den Untersuchungen der Biofilme mit der FISH-Technik waren Bereiche erkennbar, in denen 100 oder weniger (bis hin zu keinem) *P. aeruginosa*-Sondensignale pro Gesichtsfeld erkennbar waren (siehe Abb. 63 Bild 1) und dann Bereiche mit sehr vielen Sondensignalen (siehe Abb. 63 Bild 2). Eine Überschlagsrechnung verdeutlicht, dass bei einem Bildausschnitt von  $90 \times 90 \mu\text{m}$  ( $8,1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) und einer *P. aeruginosa*-Koloniezahl von  $1,3 \times 10^6 \text{ KBE/cm}^2$  ( $\text{cm}^2 = 10^8 \mu\text{m}^2$ ) mindestens 100 Zellen pro Bildausschnitt vorhanden *P. aeruginosa* sein sollten.

Um zu klären, ob es sich um inhomogene Verteilung oder um lokale Vermehrung von *P. aeruginosa* handelt, wurde ein Versuch angesetzt. In diesem Versuch wurde *P. aeruginosa* DSM 50071 in Trinkwasser, in Trinkwasser mit 1:100 CASO und in deionisiertem Wasser suspendiert (siehe auch Tabelle 8, S. 100). Wie zu erwarten war, konnte *P. aeruginosa* in der Animpfsuspension mit Trinkwasser nach der Einnistung kulturell nicht mehr nachgewiesen werden. Im deionisierten Wasser war keine eindeutige Veränderung der Koloniezahl erkennbar und in dem CASO-Ansatz war eine Erhöhung der Koloniezahl erkennbar. Bei der Untersuchung der Biofilme mit Gen-Sonden zeigte sich Unerwartetes. In dem CASO-Ansatz konnten Sonden-Signale in inhomogener Verteilung festgestellt werden. Im Trinkwasser-Ansatz und im Ansatz mit deionisiertem Wasser konnten keine eindeutigen Sonden-Signale beobachtet werden. Die Animpfsuspensionen des jeweiligen Ansatzes waren aufgrund technischer Probleme nicht überprüfbar. Kulturell konnte in den Biofilmen im Trinkwasser-Ansatz und im Ansatz mit deionisiertem Wasser nur geringe Mengen an *P. aeruginosa* DSM 50071 nachgewiesen werden. Der CASO-Ansatz verhielt sich erwartungsgemäß (ca.  $10^6 \text{ KBE/cm}^2$ ). Im Trinkwasser-Ansatz waren es ca. 30 bzw.

40 KBE/cm<sup>2</sup>. Im Ansatz mit deionisiertem Wasser waren es ca. 6,3 bzw.  $14 \times 10^2$  KBE/cm<sup>2</sup> und im CASO-Ansatz ca. 6,4 bzw.  $14 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup>. Über das Kulturverfahren konnte *P. aeruginosa* bei allen 3 Ansätzen in den Biofilmen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der FISH-Untersuchung konnten *P. aeruginosa* nicht eindeutig nachweisen, da bei weniger als  $10^4$  Zellen *P. aeruginosa* mit der FISH-Technik im Biofilm weniger als 1 Zelle *P. aeruginosa* pro Gesichtsfeld zu erwarten ist (s. o.).

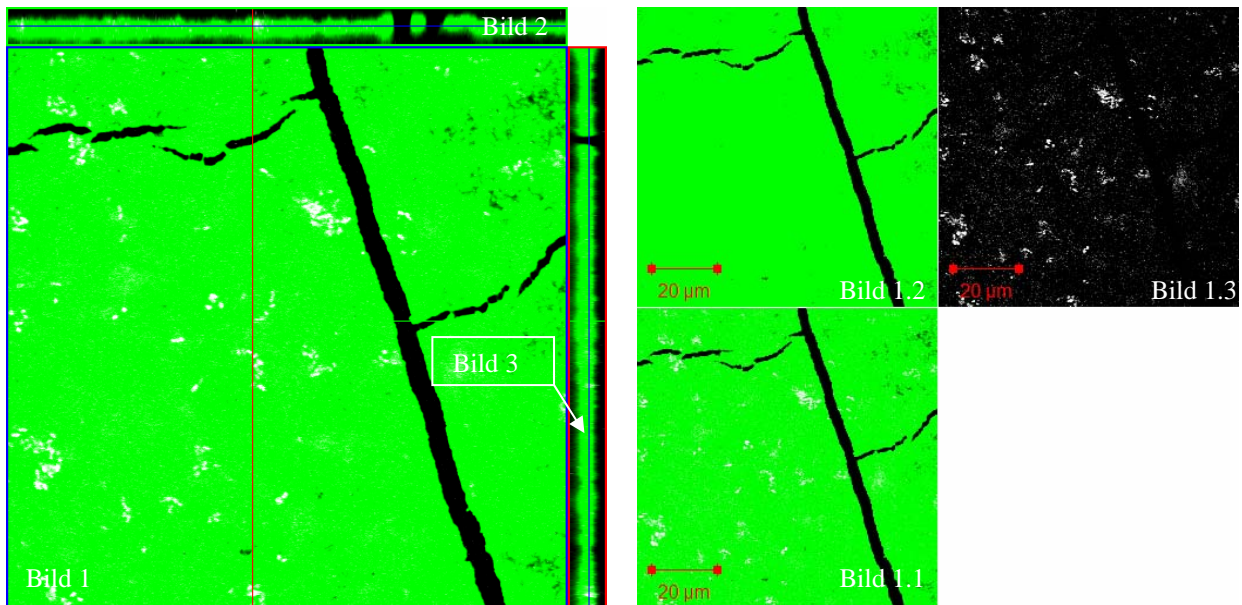
Mit beiden Techniken der FISH war *P. aeruginosa* erfolgreich in den Biofilmen nachzuweisen. Bei der mikroskopischen Betrachtung konnten mit beiden Techniken diskrete Zellen erkannt werden. Auffällig war der Unterschied in der Biofilmhöhe (vgl. Abb. 64 und 65). Die Totaldehydratisierung bewirkt eine deutliche Verringerung der Biofilm-Höhe. Mit der anderen Methode (Behandlung mit 1:1-Mischung aus Ethanol und PBS-Puffer) konnte die räumliche Struktur der Biofilme und die Verteilung von *P. aeruginosa* in den Biofilmen betrachtet werden.

In den folgenden Bilderserien (Abb. 64 und Abb. 65) zeigen Bild 1 bzw. 1.1. einen optischen Schnitt in der x-y-Ebene (Aufsicht). Bild 1.2 stellt nur die SYTO 9-Färbung (grün, alle Zellen) und Bild 1.3 die Sonden-Färbung (weiß) dar. 1.1 bzw. 1 ist das resultierende Bild aus der Überlagerung von Bild 1.2 und 1.3. Bild 2 stellt den Schnitt in der x-z-Ebene (Seitenansicht) entlang der grünen Linie, Bild 3 den Schnitt in der y-z-Ebene (Seitenansicht) entlang der roten Linie dar. Die blaue Linie markiert die Position von Bild 1 im Bildstapel. Es handelt sich um Aufnahmen bei 1000-facher Vergrößerung.



**Abb. 64:** Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eines Biofilms nach 7 Tagen in Trinkwasser nach der Einnistung von *P. aeruginosa* DSM 50071. Diese Probe wurde mit einer 1:1-Mischung aus Ethanol und PBS-Puffer behandelt.

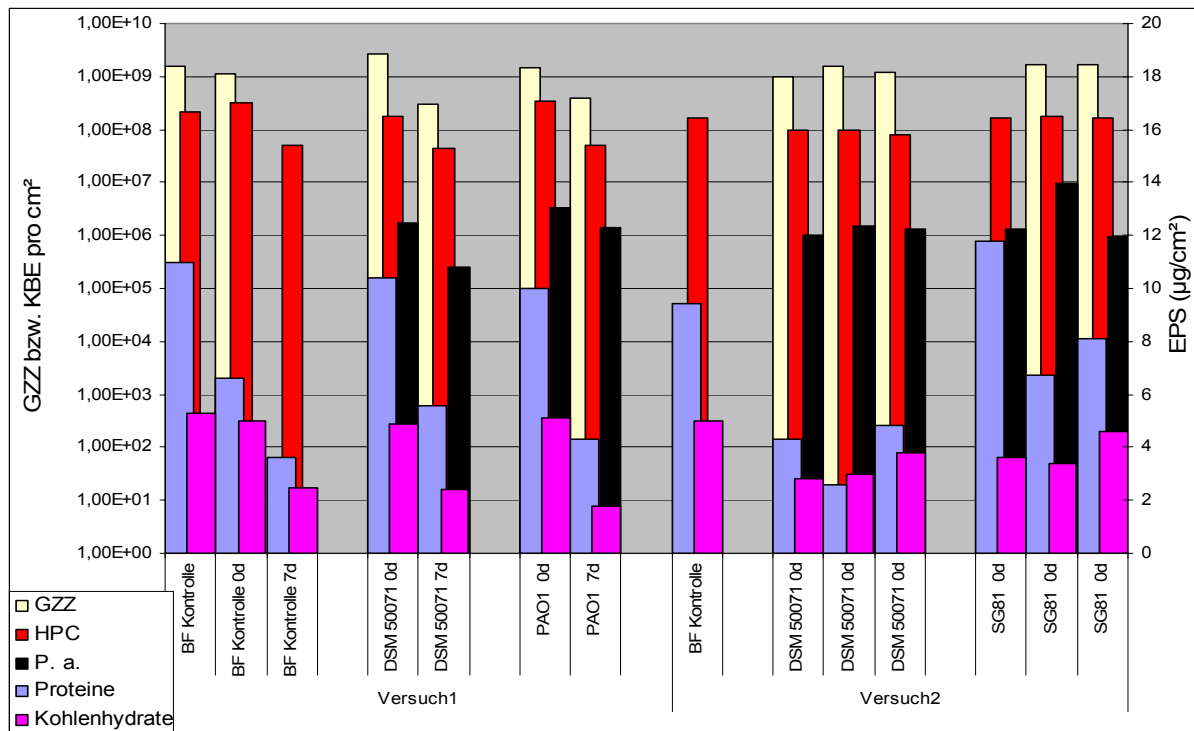




**Abb. 65:** Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eines Biofilms nach 7 Tagen in Trinkwasser nach der Einnistung von *P. aeruginosa* DSM 50071. Diese Probe wurde mit 96 %igem Ethanol behandelt.

#### 4.2.4 EPS-Isolierung von Biofilmen mit eingenistetem *P. aeruginosa*

Durch die Verwendung von Dowex war es möglich höhere Ausbeuten an EPS bei Trinkwasserbiofilmen zu erzielen (siehe 4.1.3). Eine Fragestellung war es nun, ob sich Unterschiede in den Summenparametern Protein, Kohlenhydrat und ggf. Uronsäure nachweisen lassen würden, wenn *P. aeruginosa* in den Biofilm eingenistet war. Deshalb wurde die EPS bei 2 Einnistungsexperimenten (*P. aeruginosa* DSM 50071 (DSM), PAO1 und SG81) isoliert (siehe 4.2.3). Hierbei zeigte sich, dass es möglich war, die Summenparameter Protein und Kohlenhydrat zu bestimmen (siehe Abb. 66).



**Abb. 66:** Isolierung der EPS von Trinkwasserbiofilmen bei Einnistungsexperimenten. Es wurden die Summenparameter Protein und Kohlenhydrat nach der Dialyse (Ausschlussgrenze 12.000 – 14.000 Dalton) bestimmt. Die zugehörige Größenachse ist  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Zusätzlich wurden die korrespondierenden Werte für Gesamtzellzahl (GZZ), Koloniezahl auf R2A (HPC) und auf CN-Agar (P. a.) aufgetragen. Die zugehörige Größenachse ist GZZ bzw. KBE pro  $\text{cm}^2$ .

Wie anhand von Abb. 66 erkennbar ist, konnten Unterschiede in den EPS in Abhängigkeit von den eingenisteten *P. aeruginosa*-Stämmen beobachtet werden. In Versuch 1 waren nach der Einnistung von *P. aeruginosa* PAO1 ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Protein) oder DSM 50071 ( $10,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Protein) höhere Proteinwerte nachweisbar, als in dem Kontroll-Biofilm ( $6,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Protein). Die Kohlenhydratwerte (ca.  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) waren in allen Biofilmen zu diesem Zeitpunkt ähnlich. Nach 7 Tagen in Trinkwasser waren keine eindeutigen Unterschiede feststellbar.

In Versuch 2 konnten nach der Einnistung bei dem mucoiden Stamm SG81 höhere Proteinwerte ( $6,7$  bis  $11,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), bei ähnlichen Koloniezahlen, nachgewiesen werden als bei dem nicht-mucoiden Stamm DSM 50071 ( $2,6$  bis  $4,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Wurde bei beiden Versuchen die Ergebnisse der Biofilme mit DSM 50071 miteinander verglichen, so war erkennbar, dass die Werte für Proteine und Kohlenhydrate nach der Einnistung unterschiedlich waren. Somit sind Biofilme in unterschiedlichen Versuchen nach der Einnistung diesbezüglich nicht miteinander zu vergleichen, wobei es sich hierbei nur um einzelne Ergebnisse handelt.

Die beiden Kontrollbiofilme in den 2 Versuchen lieferten zueinander ähnliche Werte.

## 5 Diskussion

Biofilme sind ubiquitär und bestehen größtenteils aus Mikroorganismen, extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) und Wasser (z. B.: Flemming und Wingender 2001b). Bei den EPS handelt es sich häufig um Kohlenhydrate, Proteine, DNA und Huminstoffe (z. B.: Flemming und Wingender 2003b). Biofilme konnten schon häufig in Trinkwasserverteilungssystemen nachgewiesen werden (z. B.: Berry et al. 2006, Långmark et al. 2005a/b, Flemming 1998). Dabei wurden sowohl dünne, unregelmäßige Beläge (z. B.: Pedersen 1990) als auch flächendeckende Beläge (z. B.: Grubert et al. 1992) beschrieben. Hierbei kann das Material eine maßgebliche Rolle spielen. Für Biofilme auf Rohrwandungen sind Werte von  $10^1$  bis  $10^7$  Zellen/cm<sup>2</sup> bekannt (Übersicht in Wingender et al. 2003). Es gibt aber auch Bereiche in Trinkwasserverteilungssystemen, wo deutlich höhere Werte gefunden wurden. Kilb et al. (2003) konnten auf EPDM beschichteten Absperrschiebern bis zu  $10^9$  Zellen/cm<sup>2</sup> nachweisen. Bei den Trinkwasserbiofilmen, die in dieser hier vorgestellten Arbeit untersucht wurden (Anzucht über 14 Tage auf EPDM), konnten ähnliche Werte gefunden werden. Im Mittel ( $n = 10$ ) lag die Zellzahl bei  $10^9$  Zellen/cm<sup>2</sup>.

Die Biofilme in Trinkwasserverteilungssystemen können ein Habitat für hygienisch relevante Organismen sein. Bei diesen Organismen handelt es sich entweder direkt um Organismen mit pathogenem Potential (z. B.: Szewzyk et al 2000) oder um Indikatororganismen (siehe TrinkwV 2001). Es gibt Untersuchungen, die solche Organismen in Trinkwasserbiofilmen nachweisen konnten (z. B.: Juhna et al. 2007, Watson et al. 2004, ESW Scientific 2002, September et al. 2007). Unter welchen Bedingungen sich diese Organismen in den autochthonen Biofilmen einnisten konnten, ist meistens nicht nachvollziehbar, da sich die genauen Bedingungen in einem solchen System kaum bestimmen lassen. Sind hygienisch relevante Organismen erst einmal in dem Biofilm etabliert, können sie dort überdauern. Kilb et al. (2003) zeigten, dass coliforme Bakterien aus Biofilmen im Trinkwasserverteilungssystem in die Wasserphase gelangen und so zu Kontaminationen führen konnten. Somit können Biofilme als punktuelle Kontaminationsquelle fungieren.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von EPS auf das Einnistungs- und/oder Persistenzverhalten von verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen in Trinkwasserbiofilme zu untersuchen. *P. aeruginosa* wurde aufgrund seiner hygienischen Relevanz als Testorganismus gewählt. In Krankenhäusern ist er für einen Teil der nosokomialen Infektionen verantwortlich (z. B. Carmeli 2008). Dass *P. aeruginosa* Biofilme bildet ist bekannt (z. B.: Tart und Wozniak 2008). Aber ob und wie er sich in bestehende Biofilme in Trinkwasserverteilungssystemen einnisten kann, wurde zuvor kaum untersucht. Allerdings gab es Hinweise, dass sich *P. aeruginosa* in solchen Biofilmen halten kann. Eine Veröffentlichung von Schwenk (2002) beschreibt eine Desinfektionsmaßnahme in einem Trinkwasserverteilungssystem, die erst nach über



70 Tagen zum Erfolg führte. Hätte es sich ausschließlich um planktonische Zellen gehandelt, wäre eine Desinfektion wohl früher erfolgreich gewesen. Hamsch et al. (2004) beschrieben 3 Fälle, in denen *P. aeruginosa* trotz Desinfektionsmaßnahmen über einen längeren Zeitraum in Trinkwasserverteilungssystemen nachgewiesen werden konnte. Auch hier war von einer Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme auszugehen. Inwieweit das Wasser in Hausinstallationen mit *P. aeruginosa* belastet sein kann, zeigten Wricke et al. (2007). Bei 173 beprobten Installationen konnten in 11 *P. aeruginosa* nachgewiesen werden. Eine Übersicht über die mikrobiologisch-hygienischen Aspekte des Vorkommens von *P. aeruginosa* in Wasser für den menschlichen Gebrauch wurde von Wingender et al. (in prep.) zusammengestellt. Hier wurden sowohl Funde von *P. aeruginosa* in der Wasserphase als auch in Biofilmen beschrieben.

Bisher sind allerdings kaum Informationen bekannt, ob sich bestimmte *P. aeruginosa*-Phänotypen (z. B.: mucoide oder nicht-mucoide) häufiger in Trinkwasserproben oder Biofilmen nachweisen ließen. Dass der Phänotyp einen Einfluss auf die Resistenz gegen Trinkwasserinhaltsstoffe wie z. B. Chlor haben kann, wurde von Grobe et al. (2001) gezeigt. Somit war ein Einfluss der EPS von *P. aeruginosa* auf die Einnistung oder Persistenz nicht auszuschließen.

Um den Einfluss von EPS auf das Einnistungs- und Persistenzverhalten charakterisieren zu können, wurden verschiedene Aspekte betrachtet. Dabei wurde einerseits der Einfluss von EPS verschiedener *P. aeruginosa*-Stämme auf das Einnistungs- und Persistenzverhalten aber auch der Einfluss der *P. aeruginosa*-Stämme auf die EPS der Trinkwasserbiofilme untersucht. Des Weiteren war der Einfluss von EPS der Trinkwasserbiofilme auf das Einnistungs- und Persistenzverhalten Gegenstand dieser Untersuchung.

Um die EPS von Biofilmen und mögliche Veränderungen der EPS charakterisieren zu können, mussten die EPS isoliert werden. Aus diesem Grund wurden Methoden für die Isolierung von EPS untersucht.

Es sollte geklärt werden, inwieweit die EPS-Isolierung mit verschiedenen Methoden die Ausbeute und Zusammensetzung der EPS von Biofilmen beeinflusste. Dazu wurde die EPS-Isolierung ausschließlich durch Dispergierung (Rühr-Methode, Stomacher-Methode), durch Verwendung eines Kationentauscherharz (Dowex) in Kombination mit verschiedenen Dispergierungsmethoden (Dowex in Kombination mit Dispergierung durch einen Propellerrührer, Vortex oder Stomacher) und die Verwendung von Formaldehyd mit und ohne NaOH untersucht. Die Ausbeute und Zusammensetzung der EPS wurde anhand von Summenparametern (Kohlenhydrate, Proteine und ggf. Huminstoffe) charakterisiert. Hauptsächlich sind bisher EPS-Isolierungsmethoden aus dem Abwasserbereich bekannt (z. B.: Liu und Fang 2003, Spaeth und Wuertz 2000, Lazarova und Manem 1995). Diese EPS-Isolierungsmethoden wurden für Proben ausgelegt, die in großen Mengen (Gramm bis Kilogramm) vorhanden sind. In dieser Arbeit sollten Biofilme anderer Herkunft untersucht werden. Es wurden Biofilme von *P. aeruginosa*-Reinkulturen, Biofilme aus der Papierherstellung, Lysimeter-Schmutzdecken und epilithische Biofilme

untersucht. Da die EPS-Isolierung von Trinkwasserbiofilmen das eigentliche Ziel war, musste eine Methode entwickelt werden, mit der kleine Probenvolumen (ca. 10 ml) zu bearbeiten waren. Hierzu war wenig bekannt, da EPS-Isolierungen bisher hauptsächlich im Abwasserbereich beschrieben wurden (s. o.).

Um den Einfluss von EPS-Komponenten verschiedener *P. aeruginosa*-Stämme auf die Einnistung und Persistenz in Trinkwasserbiofilmen zu charakterisieren, wurde die Koloniezahl von *P. aeruginosa* in den Trinkwasserbiofilmen bestimmt. Dafür wurden über 14 Tage Biofilme in Trinkwasser auf EPDM angezüchtet und anschließend 1 Tag in *P. aeruginosa*-Suspensionen inkubiert. Nach der Inkubation (Einnistung) wurden die Biofilme 7 Tage unter stagnierenden Bedingungen Trinkwasser exponiert, um das Persistenzverhalten charakterisieren zu können. Der Einfluss von *P. aeruginosa* auf die EPS der Trinkwasserbiofilme wurde durch die Charakterisierung der EPS nach der EPS-Isolierung untersucht. Der Einfluss der EPS der Trinkwasserbiofilme auf das Einnistungs- und Persistenzverhalten ist mittels der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung betrachtet worden.

## 5.1 EPS-Isolierung

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei Biofilmen um Ansammlungen von Mikroorganismen, die in einer Gelmatrix (EPS) eingebettet sind. Dadurch kommen die EPS vor den Mikroorganismen mit Inhaltstoffen (z. B. Mikroorganismen oder anderen Substanzen) des umgebenden Mediums in Kontakt. Die EPS der Biofilme können aus den verschiedensten Kombinationen der einzelnen Biopolymere (Kohlenhydrate, Proteine, DNA, Huminstoffe usw.) bestehen, während diese Biopolymere wiederum aus verschiedenen Abfolgen der unterschiedlichen Grundbausteine bestehen können. Zum Beispiel bestehen Polysaccharide aus Monosacchariden (z. B.: Sutherland 2001), während Proteine und DNA aus Aminosäuren aufgebaut sind. Um die EPS näher zu untersuchen besteht die Möglichkeit, diese zu isolieren. Aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten der Zusammensetzung der EPS und der verschiedenen kohäsiven Kräfte (z. B.: Mayer et al. 1999) ist es notwendig, die Isolierungsmethode jeweils auf die Biofilme abzustimmen. Bei der Wahl der Methode um die EPS zu isolieren kommt es auf die Fragestellung an. Dabei sind 2 grundlegende Punkte von Bedeutung. Soll die EPS möglichst in nativem Zustand oder aber soviel wie möglich isoliert werden? Um die EPS unverändert zu isolieren, muss die Isolierung "schonend" durchgeführt werden. Hierfür bieten sich reine Dispergierungsverfahren (z. B.: rühren) oder aber der Zusatz von matrixdestabilisierenden Agenzien (z. B.: Ionentauscher oder Komplexbildner) an. Hierbei werden dann native wasserlösliche EPS-Komponenten isoliert. Der Aspekt der Matrixdestabilisierung wurde anhand von Methoden mit dem Kationentauscher Dowex (Dowex-Methode, Stomacher-Dowex, Vortex-Dowex) untersucht. Geht es darum, so viel wie möglich der EPS zu isolieren, kann man versuchen wasserunlösliche Komponenten durch Zugabe von reaktiven Chemikalien (z. B.: Formaldehyd oder NaOH) in eine wasserlösliche Form zu bringen. Um diese

Möglichkeit der EPS-Isolierung zu betrachten, wurden Methoden mit Formaldehyd mit und ohne NaOH eingesetzt. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass dann wahrscheinlich nicht mehr die nativen Substanzen isoliert werden können. Um die Effektivität der EPS-Isolierung vergleichen zu können, wurden ebenfalls die EPS nur durch rühren (Rühr-Methode) isoliert. Die Isolierungen wurden an Biofilmen von verschiedenen Standorten durchgeführt. Ziel war es, durch Verwendung unterschiedlicher Methoden und Proben verschiedener Herkunft eine möglichst effektive Methode zu finden, die eine hohe Ausbeute an EPS ermöglichte, ohne die Zellen zu schädigen.

### 5.1.1 EPS-Isolierung aus Reinkulturbiofilmen von *P. aeruginosa*

Anhand von Reinkulturbiofilmen sollte der Einfluss von EPS-verbrückenden Ionen (Calcium) auf die Ausbeute an EPS bei verschiedenen EPS-Isolierungsmethoden (Rühr-Methode, Methoden mit Dowex und Methoden mit Formaldehyd mit und ohne NaOH) untersucht werden. Bei einem Reinkulturbiofilm handelt es sich um ein kontrollierbares System. Bei gleichen Anzuchsbedingungen ist ein vergleichbares Wachstumsverhalten zu erwarten. Aus diesem Grund wurde solch ein System als Einstieg in die EPS-Isolierung gewählt. Als Teststamm wurde ein mucoides Umweltisolat, der Stamm *P. aeruginosa* SG81, verwendet. Dieser wurde aus einem Biofilm in einem Ablauf isoliert (Grobe et al. 1995). Für die Untersuchungen wurde der Teststamm in deionisiertem Wasser suspendiert, auf Agar-Medium (PIA mit und ohne Calcium) ausplattiert und über Nacht bei 36 °C inkubiert. Der konfluente Biofilm wurde abgeschabt und den Isolierungsmethoden zugeführt. Für diesen Teststamm wurde gezeigt, dass er größere Mengen Uronsäuren (Alginat) produzieren kann, welches die Hauptkomponente (ca. 53 % – 84 %) der EPS ist (Wingender et al. 2001, Grobe et al. 1995). Es ist bekannt, dass Alginat mit zweiwertigen Ionen (z. B.: Calcium) interagieren kann. Emmerichs (2004) untersuchte dies anhand von Algen- und Bakterienalginat. Durch Zugabe von Calcium in das Nährmedium kann Alginat (Uronsäuren) über Calcium-Ionen verbrückt werden. Dies führt zu einer deutlichen Erhöhung der mechanischen Stabilität der Biofilme des Teststammes, wobei Calcium mit ca. 6,2 % der Masse des Biofilms nachgewiesen werden konnte (Körstgens et al. 2001).

Für die EPS-Isolierungsmethoden mit Dowex wurde das Kationentauscherharz Dowex (Dowex<sup>TM</sup> Marathon<sup>TM</sup> C früher Dowex 50 x 8) verwendet. Das stark saure Dowex besteht aus einem Basisgerüst von di-vinyl-Benzol, Substituenten sind Sulfonsäuregruppen (Herstellerangabe, Form No. 177-01915-0407). Bonner und Smith (1957) gaben die Ionenselektivität des in dieser Arbeit verwendeten Dowex-Harzes für zweiwertige Kationen wie folgt an: Ba > Pb > Sr > Ca > Ni > Cd > Cu > Co > Zn > Mg > UO<sub>2</sub>

Hierbei ist eine hohe Affinität zu Calcium-Ionen erkennbar.

Das Dowex kann in 3 Zuständen verwendet werden. Im kommerziell gelieferten Zustand (ca. 43 % Feuchtigkeit), im voll hydratisierten Zustand (ca. 61 % Feuchtigkeit) oder im getrockneten Zustand. In voll hydratisiertem Zustand konnten in Untersuchungen an *P. aeruginosa*-Biofilmen, die auf Ca-PIA angezüchtet wurden, die höchsten Ausbeuten an EPS gefunden werden, wenn Dowex mit 70 g pro g Trockenmasse (TM) eingesetzt wurde. Ein Wert von 70 g Dowex pro g Glühverlust (GV) wurde von Frølund et al. (1996) bei Belebtschlamm-Proben als geeignet angesehen. Der Unterschied zwischen Trockenmasse und Glühverlust lag bei den Reinkulturbiofilmen von *P. aeruginosa* SG81 zwischen 20 % und 37 %. Um die Versuche durchführen zu können war es allerdings wichtig, möglichst schnell die Proben zu bearbeiten. Deshalb wurde das Dowex entsprechend einer ersten Abschätzung der Trockenmasse eingewogen. Wurde Dowex in trockenem Zustand eingewogen, bewirkte dies einen höheren Gehalt an Dowex bei der Isolierung. Bei einem höheren Dowex-Gehalt konnten tendenziell weniger EPS nachgewiesen werden. Beim Einsatz des Dowex in getrocknetem Zustand wurde ein Großteil der Flüssigkeit der Biofilmsuspension von dem Dowex gebunden und eine Bestimmung der EPS-Ausbeute konnte nicht mehr eindeutig durchgeführt werden. Untersuchungen mit einem geringeren Gehalt (35 g und 50 g) als 70 g pro g TM des voll hydratisierten Dowex, zeigten hingegen keinen eindeutigen Unterschied zur Standardisolierung (70 g/g TM). Somit war bei einem Gehalt des voll hydratisierten Dowex von 70 g pro g TM kein Nachteil bezüglich der Ausbeute zu erwarten. Da es unwahrscheinlich scheint, dass ein höherer Dowex-Gehalt zu einer geringeren Ausbeute an EPS führt, bestand die Möglichkeit, dass EPS-Bestandteile von dem Dowex sorbiert werden konnten.

Aufgrund der zuvor gewonnenen Erkenntnisse wurde Dowex mit 70 g/g TM in voll hydratisiertem Zustand für die EPS-Isolierung eingesetzt.

Bei der Isolierung der EPS von *P. aeruginosa* SG81 auf PIA ohne Calcium waren mit den verschiedenen Methoden (Rühr-Methode, Dowex-Methode, Formaldehyd mit und ohne NaOH) keine eindeutigen Unterschiede in der Ausbeute oder in den Verhältnissen (Proteine, Kohlenhydrate und Uronsäuren) zueinander erkennbar. Dies ist wenig verwunderlich, da Rode (2004) schon zeigte, dass nur durch Dispergieren ca. 96 % der EPS isoliert werden konnten. Der Uronsäuregehalt von 70 % an dem Gesamtgehalt der Kohlenhydrate der EPS war ähnlich den in der Literatur bekannten Werten (53 % Wingender et al. 2001, 79 % Grobe et al. 1995, 84 % Rode 2004).

Wurde dem PIA-Nährmedium 0,1 mol/l Calcium zugegeben, veränderte sich das Aussehen des Biofilms auf dem Medium im Vergleich zu dem Biofilm ohne Calcium. Die Beschaffenheit war fester und kompakter. Eine erhöhte mechanische Stabilität der Biofilme von *P. aeruginosa* SG81, die auf Ca-PIA angezüchtet wurden, wurde von Körstgens et al. (2001) gezeigt. Bei der EPS-Isolierung zeigten sich diesmal Unterschiede in den Ausbeuten an EPS, die mit den verschiedenen Methoden erzielt werden konnten. Bei der Rühr-Methode und der Formaldehyd-Methode waren die geringsten Ausbeuten zu erhalten. Die Ausbeuten waren bei allen 3 Parametern

(Kohlenhydrate, Uronsäuren und Proteine) ähnlich. Die Methoden mit Dowex zeigten bei den Kohlenhydraten ca. 8-mal und bei den Uronsäuren 25-mal höhere Werte, als mit der Rühr-Methode erzielt werden konnte. Ein Unterschied bei den Proteinwerten ließ sich hier nicht eindeutig erkennen. Die Formaldehyd-NaOH-Methode zeigte ebenfalls höhere Ausbeuten als die Rühr-Methode und die Formaldehyd-Methode. Für Kohlenhydrate konnten mindestens 4-mal höhere, für Uronsäuren mindestens 10-mal höhere Werte bestimmt werden. Bei den Proteinen lag der Wert der Formaldehyd-NaOH-Methode mindestens 30 % höher als der Wert der Rühr-Methode. Die Ausbeuten für Kohlenhydrate und Uronsäuren waren aber nicht so hoch (ca. 50 %) wie die der Methoden mit Dowex. Bei den Proteinen waren höhere Werte (ca. 25 %), im Vergleich zu den Methoden mit Dowex, erkennbar. Wurde Formaldehyd und NaOH mit Dowex kombiniert, waren die höchsten Kohlenhydratwerte (zwischen 27 % und 60 % mehr als bei der Dowex-Methode) von allen Methoden zu erkennen. Bei den Uronsäuren und Proteinen konnte kein eindeutiger Unterschied festgestellt werden. Einen Einfluss der Dispergierungsmethode auf die Ausbeuten bei den Dowex-Methoden (Stomacher-Dowex, Vortex-Dowex, Propellerrührer-Dowex) war nicht eindeutig zu erkennen. Eine Erklärung für die hohe Ausbeute bei den Methoden mit Dowex ist, dass EPS (hier Alginat) über Calcium-Ionen verbrückt werden können. Die Calcium-Ionen können von dem Kationentauscher mobilisiert und sorbiert werden. Dies führt dann zu einer Solubilisierung von Alginat und anderen EPS.

In Umweltproben ist die Kohäsion der EPS höchstwahrscheinlich nicht nur auf Ionenverbrückung zurückzuführen. Deshalb wurden heterogenere Proben untersucht.

### 5.1.2 EPS-Isolierung aus Umweltproben

Bei Umweltbiofilmen musste mit der Anwesenheit von Huminstoffen gerechnet werden. Diese können die Proteinbestimmung nach Lowry stören. Um dies zu berücksichtigen, wurden Proteine und Huminstoffe nach einer modifizierten Lowry-Methode bestimmt. Frølund et al. (1995) zeigten, dass anhand dieser Methode eine Differenzierung von Huminstoff und Protein möglich war. Eine Überprüfung dieser Methode mit den Kalibrierungsstandards konnte dies bestätigen. Somit war es möglich Proteine und Huminstoffe zu quantifizieren.

Die Eignung der verschiedenen Methoden sollte, bei Proben unterschiedlicher Herkunft, in Bezug auf die EPS-Isolierung untersucht werden. Dazu wurden epilithische Biofilme, Lysimeter-Schmutzdecken und Biofilme aus der Papierherstellung verwendet.

Anhand des Vergleiches der Ausbeuten an EPS in Abhängigkeit von der Isolierungsmethode war erkennbar, dass Methoden mit Formaldehyd und NaOH (Formaldehyd mit NaOH und Kombinationen mit Dowex und Dispergierungsmethoden) deutlich höhere Werte für Kohlenhydrate

(bis zu 6-mal höher) und Huminstoffe (bis zu 12-mal höher) aufwiesen als Methoden nur mit Dowex. Bei den Proteinen war dieser Trend nicht so eindeutig. Die Methoden mit Dowex zeigten höhere Werte (mindestens doppelt so viel Proteine, Kohlenhydrate und Huminstoffe) als die Methoden, die nur dispergieren (Rühr-Methode, Stomacher-Methode).

Es gibt wenige methodenvergleichende Untersuchungen, die mindestens 2 der hier verwendeten Methoden berücksichtigen. Häufig stammen diese Untersuchungen dann aus dem Abwasserbereich. Rudd et al. (1983) wiesen bei einer EPS-Isolierung aus Belebtschlamm eine höhere Ausbeute an Kohlenhydraten bei einer Isolierung mit NaOH nach als mit einer Dowex-Methode (Methoden nicht genau beschrieben). Die Proteinwerte lagen in einer ähnlichen Größenordnung. EPS-Isolierungen mit Dowex lieferten bei verschiedenen pH-Werten (pH 4, 7,2 und 9) immer höhere Ausbeuten an Proteinen und Kohlenhydraten (ca. 2 bis 7-mal höher) als nur durch Dispergieren. Bei Liu und Fang (2002) war erkennbar, dass bei Belebtschlamm-Proben durch die Formaldehyd-NaOH-Methode (wie sie auch in der hier vorgestellten Arbeit verwendet wurde), im Vergleich zu einer Dowex-Methode (70 g Dowex pro g GV, 4 h, 4 °C, 600 RPM), mehr Kohlenhydrate, Uronsäuren, Proteine und Huminstoffe nachweisbar waren. Diese Dowex-Methode lieferte immer höhere Ausbeuten (ca. 2-mal höher) an EPS als die Kontrollisolierung (nur Zentrifugation 20.000 g, 20 min). McSwain et al. (2005) konnten bei der EPS-Isolierung von granulärem Schlamm mit NaOH (pH 11, 80 °C, 30 min), im Vergleich zu einer Dowex-Methode (70 g Dowex pro g GV, 4 h, 4 °C, 750 RPM), mehr Kohlenhydrate und Proteine nachweisen. Untersuchungen von Aguilera et al. (2008) zeigten, dass mit einer Dowex-Methode (2,5 g Dowex pro 1,5 g gefriergetrocknetem Biofilm, 3 h, 4 °C, 20 - 30 RPM), bei der EPS-Isolierung von extrem sauren Biofilmen aus einem Fluss (pH-Wert des Flusses lag bei 0,9 – 2,5), weniger EPS isoliert werden konnten als durch eine Methode mit Kronenether (5 ml 30 mM Kronenetherreagenz, 3 h, 4 °C, 20 - 30 RPM). Als Grund hierfür wurde von den Autoren der pH-Bereich angeführt. Das Dowex lässt sich bei niedrigem pH-Wert regenerieren, und die Selektivität verschiebt sich in Abhängigkeit des pH-Bereichs (z. B.: Pehlivan und Altun 2006). Ob dies allerdings ausschlaggebend war (die Isolierung wurde in Puffer pH 7,2 durchgeführt), ist unklar. Möglicherweise ist dieses Ergebnis durch eine geringe Scherkraft (20 - 30 RPM) beeinflusst. Der flüssige Kronenether ist wahrscheinlich eher in der Lage, die Probenmatrix zu durchdringen als die festen Dowex-Kugeln. Des Weiteren wurde nach der EPS-Isolierung der gewonnen Überstand nicht dialysiert, sondern direkt nach einem Zentrifugationsschritt gefriergetrocknet und analysiert. Somit wurden nicht ausschließlich Polymere, sondern auch kleinere Fragmente erfasst. Im Vergleich zu einer Isolierung mit Wasser (MilliQ, 3 h, 30 °C, 20 - 30 RPM) ließ sich aber mit Dowex in 2 von 3 Biofilmpuben mehr EPS isolieren.

Die zuvor angeführten Untersuchungen zeigen, dass die Isolierung von Kohlenhydraten und Huminstoffen abhängig von der angewendeten Methode war. Bei Proteinen war dieser Einfluss nicht eindeutig erkennbar. Daraus lässt sich

schließen, dass in Umweltbiofilmen nicht nur Ionenverbrückung eine Rolle bei der EPS-Kohäsion spielt. Bei solchen Proben sind auch andere kohäsive Wechselwirkungen zu erwarten (z. B.: Mayer et al. 1999, Wloka et al. 2004). Aber die Ionenverbrückung scheint zumindest eine Komponente zu sein. In fast allen Untersuchungen war mit dem Kationentauscher Dowex eine höhere Ausbeute an EPS zu erzielen als nur durch Dispergieren.

### 5.1.3 Bewertung der EPS-Isolierungsmethoden

Um die Isolierungsmethoden bewerten zu können, ist es notwendig zu wissen, ob hauptsächlich extrazelluläres Material isoliert wird. Sollten größere Mengen an intrazellulärem Material freigesetzt werden, wäre die Methode ungeeignet. Untersuchungen der Dowex-Methode anhand von Reinkulturbiofilmen von *P. aeruginosa* SG81 auf Zellschädigung lieferten keinen eindeutigen Hinweis darauf. Es wurde der DNA-Gehalt und die Aktivität des intrazellulären Enzyms Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) im zellfreien Überstand bestimmt. Hierbei war erkennbar, dass zwar mit Dowex-Methode, im Vergleich zu der Isolierung nur durch die Rühr-Methode, bis zu 90-mal mehr DNA nachgewiesen werden konnte. G6PD konnte aber nicht in deutlich erhöhten Mengen gefunden werden. Das *P. aeruginosa* G6PD enthält, wurde von Ng und Dawes (1972) gezeigt. Für den Stamm SG81 wurde von Wingender et al. (2001) nachgewiesen, dass G6PD strikt intrazellulär vorliegt. Da G6PD nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, wurde dies als Hinweis auf eine Isolierung von EPS und nicht von intrazellulärem Material angesehen.

Die Verwendung von NaOH zur Isolierung von EPS ist nicht unbedenklich. Einflüsse von NaOH auf die Zellen (Zelllyse), die EPS (chemische Veränderung) oder Störungen der Analytik sind nicht ausgeschlossen. In dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass weder die Quantifizierung der Enzymaktivität von G6PD noch die Bestimmung des DNA-Gehaltes mittels des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI dabei verwendet werden konnten. Eine Aktivität von kommerzieller G6PD war nach Kontakt mit Formaldehyd oder Formaldehyd und NaOH nicht mehr nachweisbar. Untersuchungen mit kommerzieller DNA, die der Formaldehyd-NaOH-Lösung ausgesetzt wurde, zeigten, dass nur noch 26 % der Startkonzentration nachgewiesen werden konnten. Liu und Fang (2002) führten, neben anderen Argumenten, einen geringen Gehalt an DNA bei der Formaldehyd-NaOH-Methode als Indikator für eine zellschonende (keine Zelllyse) Isolierungsmethode an. Diese Bezugsgröße ist allerdings unter Berücksichtigung des Nachweises von extrazellulärer DNA (eDNA) in Reinkulturbiofilmen nicht mehr sinnvoll. Für *P. aeruginosa* (z. B.: Barken et al. 2008, Nakamura et al. 2008, Allesen-Holm et al. 2006, Whitchurch et al. 2002) und andere Mikroorganismen (z. B. für *S. aureus*: Izano et al. 2008, für *E. faecalis*: Thomas et al. 2008,

für *S. pneumoniae*: Moscoso et al. 2006) wurde eDNA nachgewiesen. Vlassov et al. (2007) stellte eine Übersicht über das Vorkommen und die Funktion von eDNA auf.

Ob die Verwendung von NaOH allerdings die Zellen lysiert, konnte nicht eindeutig gezeigt werden. Zellyse würde intrazelluläre Bestandteile freisetzen. Bei der EPS-Isolierung von Reinkulturen (*P. aeruginosa* SG81 auf PIA) war mit der Formaldehyd-NaOH-Methode zwar ca. 20 % mehr Proteine nachweisbar als mit den anderen Methoden, allerdings kann dies nicht als Beweis für Zellyse gewertet werden. Denn Wingender et al. (2001) konnten darstellen, dass bei *P. aeruginosa* SG81-Biofilmen auf PIA ca. 46 % der Proteine extrazellulär vorliegen. Ein Großteil der Proteine (ca. 54 %) liegt also intrazellulär vor. Zellyse durch die Verwendung von NaOH müsste sich dann in einer deutlichen Erhöhung des Proteingehaltes bemerkbar machen.

Bei der Verwendung von NaOH ist erkennbar, dass sich höhere Kohlenhydrat-Werte nachweisen lassen. Sowohl eigene als auch zuvor erwähnte Untersuchungen (z. B.: Rudd et al. 1983, Liu und Fang 2002, McSwain et al. 2005) wiesen solch eine Tendenz auf. Dies könnte ein Hinweis auf die Veränderung von Polysacchariden sein. Durch chemische Reaktionen kann sich die Wasserlöslichkeit möglicherweise verbessern, oder es kann zur Hydrolyse von Biopolymeren kommen. Eigene Untersuchungen der EPS vor der Dialyse zeigten in den Umweltproben stark erhöhte Kohlenhydratwerte (bis zu 100-mal höher als bei der Dowex-Methode). Nach der Dialyse waren die Werte auch noch bis zu 6-mal höher als bei der Dowex-Methode. Möglicherweise ist dies auf den Abbau von Cellulose zurückzuführen. Cellulose ist ein in der Natur häufig vorkommendes Polysaccharid (z. B.: Sutherland 2001) und besteht aus Glucose-Bausteinen. Es ist bekannt, dass NaOH bei Raumtemperatur Cellulose chemisch und strukturell verändern kann (z. B.: Jähn et al. 2002). Nilvebrant et al. (2003) konnten eine Verringerung des Kohlenhydratanteils in Lignocellulosehydrolysaten bei NaOH-Behandlung von ca. 3 % bei 25 °C binnen einer Stunde nachweisen. Dies ist ein Hinweis auf Celluloseabbau durch NaOH unter diesen Bedingungen. Des Weiteren ist aus Untersuchungen im Bereich der Bioethanolproduktion bekannt, dass eine Behandlung von Pflanzenabfällen mit NaOH die enzymatische Hydrolyse von Cellulose verbessern kann (z. B.: Cheng et al. 2008, Chen et al. 2007). Untersuchungen zu der Hydrolyse von Cellulose unter Bedingungen wie sie in dieser Arbeit angewendet wurden (1 h, 4 °C, Formaldehyd dann 3 h, 4 °C, Formaldehyd und NaOH, siehe 3.2.2.4), sind nicht bekannt.

Bei den Methoden mit Dowex in Kombination mit Formaldehyd und NaOH war kein eindeutiger Einfluss der Behandlungsdauer (20 min bis zu 2 h) auf die Ausbeute an EPS erkennbar. Zum Beispiel EPS-Isolierungen mit Stomacher-Dowex-Formaldehyd-NaOH (20 min), Dowex-Formaldehyd-NaOH (1 h) und Dowex-Formaldehyd-NaOH (2 h), bei den Reinkulturbiofilmen von *P. aeruginosa* SG81 auf Ca-PIA, lieferten vergleichbare Ausbeuten an EPS. Auch die EPS-Isolierung mit Dowex und Vortex (20 min) und die Dowex-Methode (2 h) wiesen hier vergleichbare Werte auf. Solche



Beobachtungen konnten auch bei der EPS-Isolierung von epilithischen Biofilmen gemacht werden. Frølund et al (1996) zeigten am Beispiel von Belebtschlammproben, dass die Behandlungsdauer bei der EPS-Isolierung mit Dowex einen Einfluss auf die Ausbeute haben kann. Bei längerer Behandlungsdauer (2 h bis 17 h) waren höhere Ausbeuten zu erzielen. Im Vergleich einer zweistündigen Behandlung mit einer siebzehnstündigen verdoppelten sich die Ausbeuten ungefähr. Allerdings wurden auch mehr Zellen lysiert. Dies wurde anhand der DAPI/CTC Methode überprüft. Ab einer Behandlungsdauer von 2 Stunden nahm die Wahrscheinlichkeit der Zellschädigung deutlich zu. In einer Untersuchung von Romani et al. (2008) an Frischwasserbiofilmen war erkennbar, dass auch hier die Zeit einen Einfluss auf die Ausbeute an EPS hatte. Bei 14 Tage alten Biofilmen war nach einer 1 Stunde Behandlungszeit mit Dowex die maximale Ausbeute an Kohlenhydraten zu erzielen. In einem 30 Tage alten Biofilm war der höchste Wert nach 6 Stunden Behandlungszeit zu beobachten. Dieser Unterschied in der Behandlungsdauer (1 h bzw. 6 h) wurde von den Autoren aber als statistisch nicht signifikant angesehen. Eine Zellschädigung über den Behandlungszeitraum von 6 Stunden wurde nicht beobachtet. Die Untersuchungen über die Zellschädigung wurden mit dem Live/Dead-Kit durchgeführt. Nach sechsstündiger Behandlung mit Dowex konnte hier keine eindeutige Abnahme an "lebenden Zellen" nachgewiesen werden. Aufgrund der unterschiedlichen Erkenntnisse ist es nicht eindeutig möglich, den Einfluss der Behandlungsdauer auf die Ausbeute an EPS und die Auswirkung auf die Zellen zu bewerten.

Die Dispergierungsverfahren (Rühren, Vortex, Stomacher, Propellerrührer) können möglicherweise auch einen Einfluss auf die Ausbeute haben, da nach Frølund et al. (1996) Scherkräfte die Ausbeute beeinflussen. In der hier vorgestellten Arbeit konnte dies aber nicht eindeutig festgestellt werden. EPS-Isolierungen unter Verwendung von Dowex mit Stomacher (15 min), Vortex (20 min) und Propellerrührer (2 h) zeigten vergleichbare Ausbeuten. Nach Frølund et al (1996) kann durch eine höhere Scherkraft höhere Ausbeute an EPS erzielt werden. Die Gefahr der Zelllyse steigt aber mit zunehmender Intensität. Ob ein Einfluss der Behandlungszeit oder der Dispergierungsmethode auftritt, kann möglicherweise von der Probenmatrix abhängen. Je nach Beschaffenheit der Probe (z. B.: Festigkeit, Komponentenzusammensetzung etc.) sind Unterschiede im Verhalten bezüglich der Isolierung zu erwarten, allerdings sind hierzu keine Untersuchungen bekannt.

Aufgrund der möglichen Veränderung von EPS-Komponenten durch NaOH und/oder Formaldehyd sowie der nicht eindeutigen Bewertung der Zellschädigung, wurde die Formaldehyd-NaOH-Methode nicht weiter für die EPS-Isolierung verwendet. Der Kationentauscher Dowex liefert höhere Ausbeuten an EPS als die Isolierung nur durch Dispergieren. Eine Zellschädigung war bei der Dowex-Methode nicht nachweisbar.

Die Dowex-Methode wurde aufgrund der schonenden Isolierung (der Probe werden lediglich Kationen entzogen und dadurch werden EPS-Komponenten freigesetzt,

keine nachweisbare Zellschädigung) als am besten für die EPS-Isolierung geeignet angesehen und als Mittel der Wahl weiter verwendet.

#### 5.1.4 Miniaturisierung des Verfahrens für die EPS-Isolierung

Es sollte eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, Biofilmproben mit geringen Mengen an Probenmaterial in Bezug auf ihre EPS zu untersuchen. Ziel war es, die EPS von Trinkwasserbiofilmen, die 14 Tage auf EPDM angezüchtet wurden, zu isolieren. Auf einer Probenfläche von ca. 15 cm<sup>2</sup> sind nur sehr geringe Probenmengen (im Milligramm-Bereich) zu erwarten. Als Probe wurde der gesamte Biofilm (ca. 15 cm<sup>2</sup>) in 10 ml deionisiertem Wasser suspendiert.

Bisher sind hauptsächlich Methoden für die EPS-Isolierung beschrieben worden (siehe Tabelle 5 und 6), bei denen Proben in ausreichenden Mengen zur Verfügung standen. Dabei handelte es sich häufig um Belebtschlammproben. Liu und Fang (2003) konnten in diesem Bereich auf 75 Ergebnisse von EPS-Isolierungen zurückgreifen. Proben, die nur in geringer Menge vorliegen, wurden bisher eher vernachlässigt. So sind die Methoden auch eher für größere Ansätze ausgelegt. Bezugsgröße hierbei ist häufig die Trockenmasse oder der Glühverlust (z. B.: Frølund et al. 1996). Proben, für welche diese Parameter nur schwer bestimmbar sind, verlieren diese Bezugsgröße. Bei der EPS-Isolierung von Trinkwasserbiofilmen kann dies, aufgrund von geringen Probenmengen, der Fall sein.

Als am geeignetsten für die EPS-Isolierung wurde in dieser Arbeit die Isolierung unter Verwendung des Kationentauscherharzes Dowex angesehen. Da aber die Bezugsgröße Trockenmasse bei Trinkwasserbiofilmproben nicht bestimmt werden konnte, musste anders verfahren werden. Hierzu wurden unterschiedliche Mengen an Dowex (0 g, 1 g, 2 g, 4 g und 6 g pro 10 ml), bezogen auf das Volumen der Biofilmsuspensionen, eingesetzt. Die höchsten Ausbeuten an EPS (Kohlenhydrate und Proteine) zeigten sich bei 2 g und 4 g Dowex pro 10 ml Biofilmsuspension. Bei 1 g und 6 g Dowex pro 10 ml waren ca. 80% der Ausbeute des 2-g-Ansatzes nachweisbar. Da bei einer Menge von 6 g Dowex eine geringere Ausbeute an EPS gefunden wurde als bei 2 g Dowex, bestand die Möglichkeit, dass EPS an dem Dowex sorbierten. Um eine Überdosierung des Dowex zu vermeiden, wurde eine Menge von 2 g Dowex pro 10 ml Biofilmsuspension verwendet. Als Isolierungszeit wurden 20 min gewählt. Die Isolierung im miniaturisierten Ansatz erfolgte bei Raumtemperatur.

Durch die Verwendung von Dowex (2 g pro 10 ml Biofilmsuspension) für die EPS-Isolierung von Trinkwasserbiofilmen konnten Kohlenhydrate (ca. 4 µg/cm<sup>2</sup>) und Proteine (ca. 4 µg/cm<sup>2</sup>) erfolgreich nachgewiesen werden. Ohne Verwendung von Dowex war ein eindeutiger Nachweis nicht möglich. Somit war die Entwicklung einer Methode für die Isolierung von EPS aus Trinkwasserbiofilmen gelungen.

Im Trinkwasserbereich ist wenig über die EPS von Biofilmen bekannt. Kilb et al. (2003) konnten auf EPDM-beschichteten Absperrschiebern, abhängig von der

Expositionsdauer, variierende Werte für Kohlenhydrate und Proteine in den EPS nachweisen. Die EPS wurde durch Zentrifugation (20.000 g, 20 min, 10 °C) gewonnen. Nach 5 Wochen Exposition wurden in den EPS ca. 3 µg/cm<sup>2</sup> an Kohlenhydraten und 3,8 µg/cm<sup>2</sup> an Proteinen gefunden. Die Gesamtzellzahl wurde zu diesem Zeitpunkt mit ca. 10<sup>9</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> angegeben. Bei den unterschiedlichen Proben (5 Wochen bis zu 4 Jahren Expositionsdauer) variierten die Werte der EPS für Kohlenhydrate zwischen 0,8 und 6,2 µg/cm<sup>2</sup> und bei den Proteinen zwischen 1,2 und 12,9 µg/cm<sup>2</sup>. Die Zellzahlen lagen zwischen 2,7 x 10<sup>6</sup> und 1,8 x 10<sup>9</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>. Eine einheitliche Tendenz in den Mengen der EPS-Komponenten bezüglich der Expositionsdauer war nicht erkennbar. Dott und Schoenen (1985) zeigten, dass auf Bitumenoberflächen nach 14 Tagen Trinkwasserexposition in den Biofilmen ca. 3,2 ng Protein pro cm<sup>2</sup> und ca. 2 x 10<sup>4</sup> KBE/cm<sup>2</sup> aufzufinden waren. Kohlenhydrate konnten nicht nachgewiesen werden. Nach 12 Monaten Exposition konnten in den Biofilmen ca. 0,18 µg Proteine und ca. 5,28 µg Kohlenhydrate sowie ca. 5 x 10<sup>3</sup> KBE pro cm<sup>2</sup> aufgefunden werden. Percival et al. (1998) stellten dar, dass auf unterschiedlichen Stahloberflächen nach 12-monatiger Exposition in Leitungswasser zwischen 2,08 und 7,22 µg/cm<sup>2</sup> Kohlenhydrate in Biofilmen nachgewiesen werden konnten. Die Gesamtzellzahlen lagen hier zwischen 3,6 x 10<sup>2</sup> und 2,8 x 10<sup>3</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Werte für Kohlenhydrate und Proteine in den EPS sowie den dazugehörigen Zellzahlen der 14 Tage alten Biofilme auf EPDM zeigen, dass es sich, für Biofilme im Trinkwasserbereich, um sehr ausgeprägte Biofilme handelt. Bei ähnlichen Zellzahlen waren in der hier vorgestellten Arbeit ähnliche Werte für Kohlenhydrate und Proteine nachweisbar wie von Kilb et al. (2003) auf einem ähnlichen Material beschrieben wurden, obwohl unterschiedliche EPS-Isolierungsmethoden verwendet worden sind. Durch den Einsatz von Dowex sollte es möglich sein, mehr EPS zu isolieren als nur durch Zentrifugation. Somit besteht die Möglichkeit, dass in den älteren Biofilmen (5 Wochen), die von Kilb et al. (2003) untersucht wurden, mehr EPS vorhanden waren als nachgewiesen werden konnten. Andere Untersuchungen (Dott und Schoenen 1985, Percival et al. 1998) fanden auf anderen Materialien (Bitumenoberflächen, Stahl) deutlich weniger Zellen als hier auf EPDM gefunden wurden. Die Kohlenhydrat-Werte der Biofilme in den Untersuchungen von Dott und Schoenen (1985) und Percival et al. (1998) lagen in der Größenordnung des EPS-Anteils (ca. 4 µg/cm<sup>2</sup>) der Biofilme auf EPDM nach 14 Tagen.

Bisher sind nur 2 Veröffentlichungen im Wasserbereich bekannt, in denen EPS-Isolierungen anhand von Dowex mit so kleinen Volumina (Milliliterbereich) beschrieben wurden. Allerdings wurden andere Biofilme untersucht.

Romani et al. (2008) isolierten die EPS von Frischwasserbiofilmen auf sandgestrahltem Glas. Dafür wurden 0,5 g Dowex pro 1,5 ml Probe eingesetzt und eine Isolierungszeit von 1 Stunde bei 4 °C und 300 RPM verwendet. Nach 14 Tagen konnten ca. 7 µg/cm<sup>2</sup> Kohlenhydrat nachgewiesen werden. Allerdings wurden in den

analysierten Suspensionen noch Zellen nachgewiesen (im Bereich  $10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> Probenfläche). Nach der Zentrifugation erfolgte keine Sterilfiltration (normalerweise Filtration mit 0,2 µm Porengröße) oder Dialyse. Somit wurden nicht ausschließlich EPS analysiert.

Wie schon zuvor beschrieben, isolierten Aguilera et al. (2008) die EPS aus extrem sauren Fluss-Biofilmen mit Dowex (2,5 g Dowex pro 1,5 g gefriergetrocknetem Biofilm in 5 ml Extraktionspuffer, 3h, 4 °C, 20 - 30 RPM). Hier wurden zwischen 200 und 300 mg EPS pro g Trockenmasse des Biofilms gefunden. In dieser Untersuchung erfolgte nach der Zentrifugation weder eine Sterilfiltration noch eine Dialyse. Auch hier wurden deshalb nicht ausschließlich EPS analysiert.

## 5.2 Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von EPS auf das Einnistungs- und/oder Persistenzverhalten in bestehende Trinkwasserbiofilme (Anzucht über 14 Tage auf EPDM) anhand von verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen zu untersuchen. Hierfür wurden die nicht-mucoide Stämme DSM 50071 (Typ-Stamm), PA14 (häufig in der Biofilmforschung verwendet, z. B.: Shin et al. 2008, Jackson et al. 2004, Wozniak et al. 2003), PAO1 (Wildtyp) und 2 Lektin-Defekt-Mutanten ( $\Delta$ LecB,  $\Delta$ LecA $\Delta$ LecB) sowie die mucoiden Stämme FRD1 (klinisches Isolat), SG81 (Umweltisolat) und seine spontan nicht-mucoide Revertante SG81R1 verwendet.

Ein Teilaspekt bestand darin, Einflüsse der EPS der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme auf die Einnistung und/oder Persistenz zu untersuchen. Die mucoiden Stämme produzieren Alginat (SG81 Grobe et al. 1995, FRD1 Ohman und Chakrabarty 1981), ein saures Polysaccharid. Für PA14 ist bekannt, dass er glucosereiche EPS-Komponenten produzieren kann (Friedman und Kolter 2004a). Für PAO1 wurde beschrieben, dass er sowohl DNA-reiche (Whitchurch et al. 2002) sowie mannosereiche EPS aber auch Glucose und Rhamnose produzieren kann (Matsukawa und Greenberg 2004). Anhand der PAO1 Lektin-Defekt-Mutanten sollte der Einfluss von Lektinen untersucht werden. Lektine sind zuckerbindende Proteine. Sind die Lektine an der Zelle lokalisiert (bei PAO1 für LecB von Tielker et al. (2005) gezeigt), könnten diese einen Einfluss auf die Anheftung der Zellen an zuckerhaltige Komponenten (z. B.: EPS von Biofilmen) haben. Hierbei wäre eine Anheftung der Zellen über die Lektine an die EPS möglich.

Für die Einnistungsexperimente wurden Trinkwasserbiofilme über 14 Tage auf EPDM-Coupons angezüchtet. Bindestellen für das Lektin LecB (Zielzucker ist nach Garber et al. (1987) L-Fucose) in diesen Biofilmen, konnten mittels der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) mit fluoreszenzmarkiertem LecB nachgewiesen werden. Das Substratum für die Experimente (EPDM) wurde aufgrund seiner Förderung der Biofilmbildung ausgewählt. Es war bekannt, dass sich Biofilme darauf bilden können (Kilb et al. 2003). Auf diesem Material wurden deutlich höhere Zellzahlen in den Biofilmen gefunden als üblicherweise im Trinkwasserverteilungssystem auffindbar sind (Wingender und Flemming 2004).

Rogers et al. (1994) zeigten, dass elastomere Materialien, im Vergleich zu Stahl oder PVC, schneller besiedelt und auf ihnen ausgeprägtere Biofilme gebildet werden. EPDM wird in Trinkwasserverteilungssystemen auf weichdichtenden Absperrschiebern eingesetzt. Kilb et al. (2003) konnten zeigen, dass das punktuelle Vorkommen von Biofilmen, die coliforme Bakterien enthielten, ausreichte, um die Wasserphase nachweisbar zu kontaminieren.

In den Laborexperimenten beobachtet werden, dass nach 14 Tagen ein quasi-stationärer Zustand des Biofilms erreicht wurde (Bressler 2002, Bressler in prep.). Die Gesamtzellzahl nach 14 Tagen Anzucht lag im Bereich von  $7 \times 10^7$  und  $3 \times 10^9$  Zellen pro  $\text{cm}^2$ . Die Koloniezahl auf R2A-Medium variierte zwischen  $2 \times 10^7$  und  $4 \times 10^8$  KBE/ $\text{cm}^2$ , wobei 10 % bis 30 % aller Zellen anhand der Koloniezahl nachgewiesen werden konnten. Dieses sind für Trinkwasserverhältnisse recht hohe Werte. Die Angaben in der Literatur variieren von 0,0004 % bis zu 24% (Wingender und Flemming 2004).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass die 14 Tage alten Trinkwasserbiofilme, die für die Einnistungsexperimente verwendet wurden, reproduzierbar angezüchtet werden konnten. Innerhalb eines Reaktors waren nahezu gleiche Muster in der Denaturierenden-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) nachweisbar (Bressler in prep.). Dies ließ den Schluss zu, dass in Biofilmen innerhalb eines Reaktors kaum Unterschiede in der Population vorlagen. Die DGGE wurde bereits eingesetzt, um die Diversität von Biofilmen zu untersuchen (z. B.: Rickard et al. 2004). Die Biofilme in unterschiedlichen Reaktorläufen wiesen eine Ähnlichkeit von ca. 71 % auf (Bressler in prep.). Aufgrund der ähnlichen Gesamtzellzahlen, Koloniezahlen, Verhältnis Gesamtzellzahl/Koloniezahl, Kolonietypen und Zusammensetzung der Biofilmpopulationen sind die Biofilme unabhängig von der Position im Reaktor oder des Reaktorlaufes miteinander vergleichbar. Aufgrund dessen sollten vergleichende Untersuchungen der Einnistung von *P. aeruginosa* durch die Trinkwasserbiofilme kaum beeinträchtigt werden.

Um *P. aeruginosa* in die Trinkwasserbiofilme einzunisten, mussten Suspensionen hergestellt werden. Hierzu würde sich Trinkwasser anbieten, um möglichst praxisrelevante Bedingungen zu simulieren. Wurde *P. aeruginosa* (getestet an den nicht-mucoiden Stämme DSM 50071, PA14, PAO1 und der mucoide Stamm SG81) allerdings direkt in das Trinkwasser gegeben, konnte dieser kulturell nach 1 Tag kaum wiedergefunden werden. Die nicht-mucoiden Stämme waren zu Beginn des Experimentes mit ca.  $10^6$  KBE/ml nachweisbar. Nach 1 Tag konnte über das Kultivierungsverfahren keiner dieser Stämme mehr nachgewiesen werden. Der mucoide Stamm SG81 war noch mit ca.  $10^2$  KBE (bei vergleichbarer Startkonzentration) nachweisbar. Bei der Untersuchung des Trinkwassers konnte eine Konzentration an freiem Chlor von  $>0,01$  bis  $0,02$  mg/l gemessen werden.

Aufgrund der geringen Menge an freiem Chlor wurde davon ausgegangen, dass Chlor nicht die alleinige Ursache der Inaktivierung (mit Kultivierungsmethoden nicht mehr nachweisbar) sein konnte. Eine Vergleichsuntersuchung mit einem anderen

Trinkwasser mit ähnlicher Konzentration an freiem Chlor (ca. 0,01 mg/l) zeigte, dass nach 1 Tag *P. aeruginosa* mit Kultivierungsmethoden, wenn auch in geringerer Konzentration (ca.  $10^3$  KBE/ml) als zu Beginn des Versuches (ca.  $10^6$  KBE/ml), noch nachweisbar war.

Untersuchungen von Grobe et al. (2001) an einem mucoiden und einem nicht mucoiden Stamm zeigten, dass der mucoid Stamm besser gegen Chlor im Wasser geschützt war. Bei einer Konzentration von ca. 0,1 mg/l freiem Chlor und  $10^6$  Zellen pro ml wurde in 2 Trinkwässern eine Abnahme der Koloniezahl innerhalb von 5 min bei dem mucoiden Stamm um 0,39 bzw. 1,36 log-Stufen festgestellt. Bei dem nicht mucoiden Stamm waren es 0,93 bzw. 3,30 log-Stufen. Die beiden Trinkwässer mit ähnlicher Konzentration an freiem Chlor (0,12 und 0,11 mg/l) lieferten unterschiedliche Ergebnisse in der Inaktivierung. Auch hier scheinen noch andere Faktoren außer Chlor eine Rolle bei der Inaktivierung von *P. aeruginosa* zu spielen.

Da die Trinkwasserinstallationen des Gebäudes hauptsächlich aus Kupferrohren bestanden, wurde der Kupfergehalt des Trinkwassers bestimmt. Kupfer konnte mit ca. 80 µg/l nachgewiesen werden. Das Kupfer auf Mikroorganismen toxische Auswirkungen haben kann ist bekannt (z. B.: Borkow und Gabbay 2005). Somit stellte sich die Frage, ob Kupfer in diesem Konzentrationsbereich (ca. 80 µg/l) auch einen inaktivierenden Einfluss auf *P. aeruginosa* hat.

### 5.2.1 Auswirkungen von im Wasser gelöstem Kupfer auf *P. aeruginosa*

Kupfer und andere Schwermetalle sind für Mikroorganismen in gewissen Mengen notwendig zum Leben. Allerdings können zu hohe Konzentrationen auch zu Zellschädigung führen (z. B.: Nies 1999). Domek et al. (1984) zeigten dies am Beispiel von coliformen Bakterien. Hierbei konnten Zellschädigungen von 90 % bei einer Konzentration von 50 µg Kupfer pro Liter nach 2 Tagen nachgewiesen werden. Bei 25 µg Kupfer pro Liter waren nach 6 Tagen 90 % geschädigt. Die Anfangskonzentration wies jeweils  $1,1 \times 10^5$  KBE/ml auf. Die Versuche wurden in einem anorganischen Puffer durchgeführt. Die Kupferkonzentrationen entsprechen in etwa denen, die in der hier vorgestellten Arbeit nachgewiesen werden konnten (ca. 80 µg/l). Somit sind schädigende Effekte von Kupfer in Konzentration von weniger als 100 µg/l in Wasser bei Gram-negativen Bakterien (zumindest für *E. coli* und *P. aeruginosa*) zu erwarten.

Es sollte nun untersucht werden, inwieweit Kupfer einen Einfluss auf die Kultivierbarkeit von planktonischen *P. aeruginosa*-Bakterien hat. Dazu wurden 2 *P. aeruginosa*-Stämme (der nicht-mucoid Stamm DSM 50071 und der mucoid Stamm SG81) verschiedenen konzentrierten Kupferlösungen ausgesetzt. Diese Experimente belegten, dass Kupfer im Konzentrationsbereich wie er in dem verwendeten Trinkwasser nachzuweisen war (ca. 80 µg/l), *P. aeruginosa* vollständig inaktivieren konnte. Die dazu verwendete Konzentration von *P. aeruginosa* war vergleichbar mit denen der Einnistungsexperimente (ca.  $10^6$  KBE/ml). Ähnliche Ergebnisse wurden schon im Jahr 2002 erzielt (Bressler 2002). Anhand dessen

konnte davon ausgegangen werden, dass Kupfer alleine schon in der Lage war, *P. aeruginosa* zu inaktivieren. Allerdings zeigten sich zwischen den beiden Stämmen Unterschiede. Der mucoide Stamm SG81 zeigte in einem der Experimente eine höhere Toleranz gegen Kupfer als der nicht-mucoide DSM 50071. Bei einer Kupferkonzentration von 20 µg/l konnte der mucoide Stamm noch über das Kultivierungsverfahren nachgewiesen werden (ca.  $10^3$  KBE/ml), während der nicht-mucoide Stamm bei dieser Konzentration schon nicht mehr nachweisbar war. Beide Stämme wurden in vergleichbaren Konzentrationen (Startkonzentration DSM 50071  $5,7 \times 10^6$  KBE/ml, SG81  $3,6 \times 10^6$  KBE/ml) eingesetzt. Die erhöhte Toleranz des mucoiden Stammes SG81 gegen Kupfer ist möglicherweise auf EPS-Komponenten zurückzuführen.

Eine inaktivierende Wirkung von Kupfer auf *P. aeruginosa* wurde schon häufiger beschrieben. Huang et al. (2008) untersuchten den inaktivierenden Effekt von Kupfer anhand eines nicht näher beschriebenen *P. aeruginosa*-Umweltstammes. Kupferkonzentrationen von 0,1 bis 0,8 mg/l in deionisiertem Wasser waren ausreichend, um diesen Stamm innerhalb von 1,5 Stunden nicht mehr über Kultivierungsverfahren nachweisen zu können. Die Konzentration des Inokulums lag bei  $3 \times 10^6$  KBE/ml. Hwang et al. (2006) konnten für *P. aeruginosa* ATCC 10145 (entspricht dem DSM 50071) in ihren Untersuchungen eine vollständige Inaktivierung der Zellen ( $1,85 \times 10^7$  Zellen/ml) nach 3 Stunden bei einer Kupferkonzentration von 400 µg/l Kupfer nachweisen. Bei einer Kupferkonzentration von 150 µg/l war *P. aeruginosa* nach 8 Stunden vollständig inaktiviert. Als Suspensionsmedium wurde synthetisches Trinkwasser verwendet. Teitzel und Parsek (2003) stellten dar, dass *P. aeruginosa* PAO1 in Biofilmen besser vor Schwermetallen geschützt war als planktonische Zellen. Untersucht wurden Kupfer, Zink und Blei. Der Biofilm wies bezüglich Kupfer eine bis zu 600-mal höhere Toleranz auf als die planktonischen Zellen. Die minimale Inhibitionskonzentration (MIC) für planktonische Zellen wurde für Kupfer mit 2 mM (127 mg/l) angegeben.

Die Experimente in der hier vorgestellten Arbeit mit Kupfer-Lösung zeigten bei dem mucoiden Stamm SG81 eine höhere Toleranz gegen Kupfer als der nicht mucoide Stamm DSM 50071. Allerdings waren beide Stämme ab 60 µg/l Kupfer kulturell nicht mehr nachweisbar. Teitzel und Parsek (2003) gaben eine minimale Inhibitionskonzentration bei planktonischen PAO1-Zellen von 127 mg/l Kupfer an. Dies scheint ein sehr hoher Wert im Vergleich zu der hier gefundenen Konzentration. Allerdings wurde in der Arbeit von Teitzel und Parsek (2003) für die Bestimmung Nährlösungen verwendet, die organische Verbindungen enthielten. Dabei zeigte sich auch, dass ein anderes Nährmedium zu deutlich anderen Ergebnissen für die Bestimmung der minimalen Biozidkonzentration (MBC) führte. In MSVP-Puffer (Minimal-Salz-Vitamin-Pyruvat-Puffer) lag sie bei 0,125 mM und in MOPSO-Puffer (3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure) bei 0,01 mM Kupfer. Möglicherweise ist dies auf die Komplexierung von Kupfer durch organische Inhaltsstoffe (wie z. B. Vitamine oder Pyruvat) zurückzuführen. Huang et al. (2008) zeigten bei einem *P. aeruginosa*-Umweltisolat eine 99,999 %ige Inaktivierung bei

100 µg/l Kupfer innerhalb von 1,5 Stunden bei einem Inokulum mit  $3 \times 10^6$  KBE/ml. Hwang et al. (2006) konnten *P. aeruginosa* DSM 50071 binnen 8 Stunden mit einer Kupferkonzentration von 150 µg/l bei einer Inokulumkonzentration von  $1,85 \times 10^7$  Zellen/ml vollständig inaktivieren. Diese Konzentrationen liegen in einer ähnlichen Größenordnung mit den in dieser hier vorgestellten Arbeit gefundenen Werten (vollständige Inaktivierung bei weniger als 80 µg/l Kupfer innerhalb von 1 Tag bei einer Koloniezahl von ca.  $10^6$  KBE/ml).

Eigene Experimente zeigten, dass nicht-mucoide *P. aeruginosa*-Stämme im Trinkwasser (Labor U123) 1 Tag nicht "überleben" (anhand von Kultivierungsverfahren nachweisbare Bakterien) konnten. Bei dem mucoiden Stamm SG81 war die Wahrscheinlichkeit höher, noch kultivierbare Bakterien nachzuweisen. Weitere Experimente sollten klären, ob sich der nicht-mucoide Stamm DSM 50071 und der mucoide Stamm SG81 in ihrem Verhalten bezüglich Trinkwasser unterscheiden.

Zuerst wurde überprüft, ob sich die beiden Stämme, nachdem sie für 1 Tag mit Trinkwasser in Kontakt waren, durch Zugabe von Nährmedium wieder über Kultivierungsverfahren nachweisen lassen würden. Nach der Trinkwasserexposition waren beide Stämme nicht mehr nachweisbar, allerdings konnten sie nach 3 Tagen in der Nährlösung wieder nachgewiesen werden. Somit wurden sie zumindest nicht vollständig inaktiviert. Ob es sich dabei um "wiedererwachte" Bakterien (aus dem VBNC-Zustand, VBNC = viable-but-not-culturable) oder nur um ein Anwachsen von überlebenden Bakterien handelte, ist ungeklärt. Im VBNC-Zustand sind potentiell vermehrungsfähige Mikroorganismen nicht mehr über Kultivierungsmethoden nachweisbar (z. B.: Kell et al. 1998). Der VBNC-Zustand kann durch Stress (z. B.: Temperatur, Nahrungsangebot etc.) hervorgerufen werden, wobei die Bakterien in eine Art Ruhezustand (z. B.: verminderter Stoffwechsel) übergehen (z. B.: Oliver 2005). In einem anderen Experiment wurde untersucht, ob sich die beiden Stämme (DSM 50071 und SG81) in einem anderen Trinkwasser (Hausinstallation Duisburg-Rheinhausen, ähnliche Chlorkonzentration von ca. 0,01 mg/l, aber nur ca. 8 µg/l Kupfer) nach 1 Tag noch anhand von Kultivierungsverfahren nachweisen lassen würden. Vergleichend dazu wurde auch das Trinkwasser der Universität Duisburg-Essen (Labor U123) untersucht. In dem Trinkwasser des Labors (Labor U123) waren beide Stämme nicht mehr nachweisbar, in dem anderen Wasser (Hausinstallation Duisburg-Rheinhausen) noch ca.  $10^3$  KBE/ml. Nach einem Tag in Nährlösung konnte der mucoide Stamm auch in dem Trinkwasser des Labors wieder nachgewiesen werden. Die Inaktivierung von *P. aeruginosa* könnte somit abhängig von den Inhaltsstoffen (z. B. Kupfer) im Wasser der jeweiligen Hausinstallation sein. In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, ob sich diese beiden Stämme (DSM 50071 und SG81), suspendiert in Trinkwasser, auf unbewachsenen EPDM-Oberflächen ansiedeln und persistieren konnten. Der nicht-mucoide Stamm konnte nicht mehr mit Kultivierungsverfahren nachgewiesen werden. Der mucoide Stamm SG81 war nach 7 Tagen in der Wasserphase und nach



14 Tagen sowohl in der Wasserphase als auch in dem Biofilm nachweisbar, wenn auch in geringen Konzentrationen (im Bereich von  $10^1$  KBE pro ml bzw.  $\text{cm}^2$ ).

Aus diesen Experimenten ließ sich folgern, dass der mucoide Stamm SG81 eine höhere "Überlebenswahrscheinlichkeit" in Trinkwasser aufwies, als der nicht-mucoide Stamm DSM 50071. Somit konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass mucoide *P. aeruginosa*-Stämme besser gegen Kupfer und andere Trinkwasserinhaltsstoffe geschützt sind als nicht-mucoide Stämme.

Die beiden mucoiden Stämme SG81 und FRD1 können bei der Erstellung des Inokulums noch Alginat mitführen. In Untersuchungen der EPS der beiden Stämme nach 2-mal 3 Tagen auf R2A (Standardisierte Anzuchsbedingungen für die Einnistungsexperimente) konnten noch Uronsäuren nachgewiesen werden. Dies könnte sich in einer erhöhten Toleranz gegen Kupfer bemerkbar machen. Hierbei könnte Kupfer, ähnlich wie Calcium, mit dem Alginat interagieren. Für Algen-Alginat und Kupfer wurde dies von Zheng et al. (1994) gezeigt.

Die Zellschädigung durch Kupfer kann durch membrangebundenes Kupfer bewirkt werden (Rodriguez-Montelongo et al. 1993). Das sich Kupfer an die Zellhülle von *E. coli* K12 anlagern kann, wurde schon von Beveridge und Koval (1981) gezeigt. Toxische Effekte von Kupfer auf Mikroorganismen wurden von Borkow und Gabby (2005) dargestellt. Hierbei wurde die toxische Wirkung von Kupfer auf die Zellmembran, die DNA und Proteine beschrieben. Die Zellschädigung durch Kupfer muss nicht zwangsläufig letal sein, sondern kann auch zu dem viable-but-not-culturable (VBNC) Zustand (s. o.) führen. Dieser VBNC-Effekt von Kupfer wurde von Grey und Steck (2001) für *E. coli* und für andere Gram-negative Bakterien (*Agrobacterium tumefaciens* und *Rhizobium leguminosarum*) von Alexander et al. (1999) gezeigt.

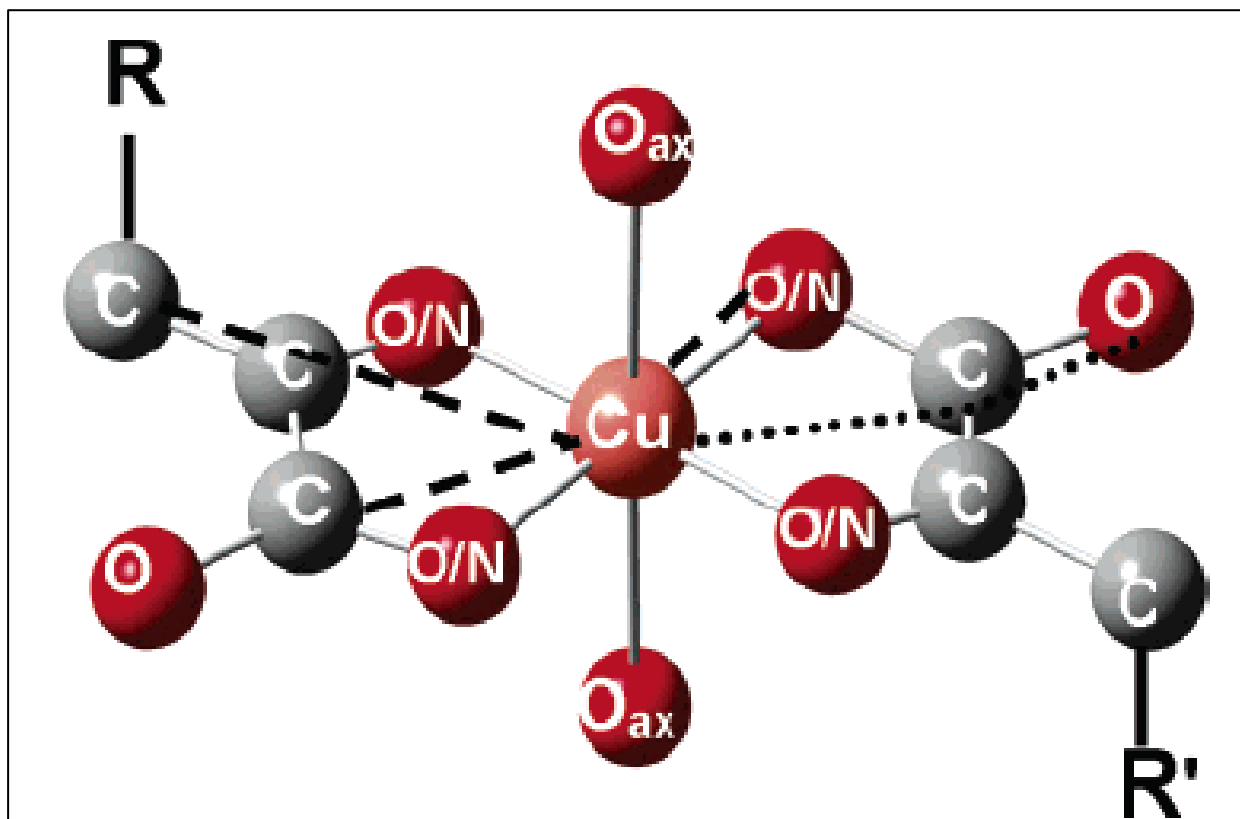
In der Umwelt können Schwermetalle wie Kupfer anorganisch oder organisch sorbiert werden (Morel und Palenik 1989). Da in Biofilmen ein hoher Anteil an organischen Verbindungen vorhanden ist, wird dieser Aspekt etwas genauer betrachtet. Das Biofilme Wasserinhaltsstoffe wie z. B. Schwermetalle sorbieren können wurde von Flemming und Leis (2002) beschrieben. Flemming (1995) stellte verschiedene Sorptionsbereiche, wie die EPS, die Zellwände, die Lipidmembrane und das Cytoplasma, in Biofilmen dar. Von Sand und Gehrke (2006) wurde dargestellt, dass Eisen(III)-Ionen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) als ( $\text{Fe}^{3+}$ )-Glucuronsäure-Komplexe in den EPS von *Acidithiobacillus ferrooxidans* sorbiert werden können. Die Bedeutung der EPS als Sorptionsbereich für Kupfer wurde von Mittelman und Geesey (1985) aufgezeigt. Wie EPS zusammen mit Schwermetallen in Biofilmen charakterisiert werden können, wurde von Wuertz et al. (2001) beschrieben. Die Visualisierung von Schwermetallen direkt in Biofilmen ist ebenfalls möglich. Eine Methode für Nickel und Zink wurde von Wuertz et al. (2000) aufgezeigt. Die Sorption von Kupfer in Umweltbiofilmen wurde in einer Studie in den USA (Farag et al. 2007) anhand von Biofilmen in einem Fluss untersucht. Hierbei konnten 15 – 4620  $\mu\text{g}$  Kupfer pro g TM nachgewiesen werden. Die EPS sind die Komponenten, die zuerst mit den Schwermetallen in Berührung kommen. Untersuchungen von Jang et al. (2001) zeigten bei Belebtschlammproben,

dass die Affinität von Schwermetallen bei diesen Biofilmen mit  $\text{Cu} > \text{Pb} > \text{Ni}$  angegeben werden konnte. Der pH-Wert lag bei 7,5. Es war eine Konzentration von bis zu 14 mg Kupfer pro g TM des Schlamms nachweisbar während EPS im Bereich zwischen 30 - 60 mg/g TM bestimmt werden konnten.

Von Liu et al. (2001) waren bei Untersuchungen mit Belebtschlammproben eine Bindungskapazität für Kupfer von 1,12 mg Kupfer pro mg EPS feststellbar.

Comte et al. (2008) untersuchten ebenfalls die EPS von Belebtschlammproben. In dieser Untersuchung zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Anzahl der Bindungsstellen für Schwermetalle (Kupfer, Blei und Cadmium) vom pH-Wert. Die Anzahl nahm mit steigendem pH-Wert zu. Hierfür wurde von den Autoren die Abnahme an deprotonierten Substituenten bei niedrigerem pH-Wert verantwortlich gemacht. Bei einem pH-Wert von 6 und weniger war die Affinität der EPS in Bezug auf die Schwermetalle  $\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Cd}$ , bei einem pH-Wert von 7 oder höher  $\text{Cu} > \text{Pb} > \text{Cd}$ . Als Erklärung wurde von den Autoren die unterschiedliche Reaktivität der Substituenten bei verschiedenen pH-Werten angeführt. EPS-Komponenten konnten direkt die Löslichkeit von Kupfer beeinflussen. Dies zeigte sich bei einem Vergleich von Reinstwasser und EPS-Lösung. In Reinstwasser lag ab pH 7 der größte Teil des Kupfers als unlösliches Kupferoxid vor. In EPS-Lösung konnte unlösliches Kupfer erst ab pH 8 gefunden werden.

Genauere Untersuchungen, wie Kupfer von natürlichen organischen Verbindungen komplexiert wird, wurden von Karlsson et al. (2006) durchgeführt (siehe Abb. 67).



**Abb. 67:** Kupferkomplex von Kupfer mit natürlichen organischen Verbindungen  
(aus Karlsson et al. 2006)

Adapted with permission from Environ. Sci. Technol.: Karlsson et al., Complexation of copper (II) in organic soils and in dissolved organic matter – EXAFS evidence for chelate ring structures, 40, S. 2623 – 2628. Copyright 2006 American Chemical Society.

Das Kupferatom wird von 4 Sauerstoff- oder Stickstoffatomen äquatorial koordiniert. In dieser Studie zeigte sich, dass weniger als 0,2% des Kupfers (990 -11.000 µg Kupfer pro g TM) frei vorlag.

Die Wechselwirkung von Kupfer mit Biofilmen von *P. aeruginosa* ist bekannt. Zum Beispiel konnten Quershi et al. (2001) bei Biofilmen von *P. aeruginosa* CNG156 die Sorption von Kupfer nachweisen. Manche *P. aeruginosa* Stämme sind in der Lage größere Mengen an Alginat zu produzieren. Das Alginat sollte, aufgrund seiner Bausteine (Mannuronat (M) und Guluronat (G)), die Möglichkeit haben, mit mehrwertigen Ionen zu interagieren. Zheng et al. (1994) zeigten dies am Beispiel von Algen-Alginat. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen der Struktur des Calcium-Alginates (Ca-Alginat) und der Sorption von Kupfer aufgezeigt. Alginat besteht aus den Monomeren Mannuronat (M) und Guluronat (G), die in bestimmten Abfolgen auftreten können. Bereiche in denen nur Guluronat vorkommt, werden G-Blöcke, Bereiche in denen nur Mannuronat vorkommt, werden M-Blöcke und Bereiche, in denen Mannuronat und Guluronat vorkommt, werden MG-Blöcke genannt (z. B. Mikkelsen und Elgsaeter 1995). Mit zunehmendem Anteil der MG-Blöcke und der Abnahme von G-Blöcken konnte ein höheres Absorptionsvermögen von Kupfer bei Ca-Alginat festgestellt werden. Dies wurde von den Autoren auf die geringere Austauschmöglichkeit von Kupfer gegen Calcium in G-reichen Alginaten zurückgeführt, da diese eine hohe Stabilität aufwiesen. MG-Bereiche interagieren nur schwach mit Calcium-Ionen, deshalb lassen sich dann Calcium-Ionen leichter austauschen. Die Struktur von Alginat des Stammes *P. aeruginosa* SG81 wurde von Schürks et al. (2002) untersucht. Hierbei wurden MMG, GMM und MMM Triaden nachgewiesen. GGG Triaden konnten in diesem Alginat nicht beobachtet werden. Das Sorptionsvermögen des Alginates von Stammes *P. aeruginosa* SG81 bezüglich Kupfer wurde bisher noch nicht beschrieben.

Kupfer kann die Alginatsynthese beeinflussen. Leitão und Sá-Correia (1997) zeigten an dem mucoiden *P. aeruginosa* 8821M, dass 4 Enzyme, die für die Alginatsynthese notwendig sind, von Kupfer unterschiedlich beeinflusst werden können. Die 4 Enzyme waren Phosphomannoseisomerase (PMI), GDP-mannose-pyrophosphorylase (GMP), Phosphomannomutase (PMM) und GDP-mannose-dehydrogenase (GMD). GDP steht für Guanosindiphosphat. GMD wurde von Kupfer kaum beeinflusst, während die anderen 3 Enzyme in ähnlicher Weise inhibiert wurden. Daraus resultierend waren, je nach Kupferkonzentration, Veränderungen im Alginat zu erkennen, oder aber ab 4 mM Kupfer gar keine Alginatproduktion mehr nachweisbar.

Aus den zuvor angeführten Untersuchungen lässt sich schließen, dass Kupfer von Biofilmen sorbiert werden kann und die EPS einen bedeutenden Anteil daran haben. EPS können mit Kupfer wechselwirken jedoch hängen die Sorptionseigenschaften von den jeweiligen Bedingungen (z. B.: pH-Wert) ab. Alginat (EPS-Bestandteil, saures Polysaccharid) ist in der Lage, Kupfer zu sorbieren. Allerdings kann die Alginatsynthese durch Kupfer beeinflusst werden. Sollten Bakterien von EPS

umgeben sein, die Kupfer sorbieren können, so sind sie besser gegen diesen Stoff geschützt. Daher ist die höhere Resistenz der mucoiden *P. aeruginosa*-Stämme gegen Kupfer möglicherweise auf das Vorhandensein von Alginat zurückzuführen.

Wie zuvor (siehe 5.2) schon beschrieben wurde, konnte *P. aeruginosa* von Trinkwasserinhaltsstoffen inaktiviert werden. Um eine Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme zu ermöglichen, wurden dem Trinkwasser Nährstoffe zugefügt. In der hier vorgestellten Arbeit konnte bei einer Zugabe von 300 mg/l Nährstoff (CASO) der Effekt von Kupfer neutralisiert werden. Kupfer wird wahrscheinlich von organischen Nährstoffen komplexiert. In komplexierter Form scheint Kupfer nicht mehr so stark inaktivierend auf *P. aeruginosa* zu wirken wie in freier Form.

Es konnte gezeigt werden, dass die Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme unter Verwendung eines organischen Nährstoffes (CASO 300 mg/l) möglich war. Nach der Einnistungsphase konnte eine Vermehrung der Zielorganismen festgestellt werden. Eine Verwendung von geringeren Nährstoffmengen (z. B.: 30 mg/l) würde zu einer geringeren Vermehrung von *P. aeruginosa* in der Animpfsuspension führen, Versuche zeigten aber, dass dann eine störungsfreie Einnistung nicht gewährleistet werden konnte. Hierbei konnte eine Inaktivierung der Zellen nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurden die Einnistungsexperimente mit 300 mg/l Nährstoff durchgeführt.

### **5.2.2 Einnistungsverhalten von *P. aeruginosa* in Bezug auf die unterschiedlichen Stämme**

Nachdem *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme eingenistet werden konnte, sollte der Einfluss der Startkonzentration auf das Einnistungsverhalten untersucht werden. Dazu wurden Einnistungsversuche mit verschiedenen Startkonzentrationen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Startkonzentration Auswirkungen auf die Koloniezahl von *P. aeruginosa* im Biofilm direkt nach der Einnistung hatte. Bei einer Start-Animpfsuspension von  $1,3 \times 10^4$  KBE/ml ließen sich  $2,3 \times 10^4$  KBE/cm<sup>2</sup> im Biofilm nachweisen. Eine Start-Animpfsuspension mit  $3 \times 10^5$  KBE/ml führte zu einer Koloniezahl von  $7,4 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> im Biofilm und eine Konzentration von  $3,4 \times 10^6$  KBE/ml in der Start-Animpfsuspension zu Koloniezahlen zwischen  $1,0 \times 10^5$  und  $3,4 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> an *P. aeruginosa* DSM 50071 im Biofilm. Da bei einer Konzentration von  $3,4 \times 10^6$  KBE/ml in der Start-Animpfsuspension auch Koloniezahlen von ca.  $10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> in einem Biofilm nachgewiesen werden konnten, scheint nicht nur die Startkonzentration für die Koloniezahl von *P. aeruginosa* DSM 50071 im Biofilm ausschlaggebend zu sein. Hierbei ist ein Einfluss des Trinkwasserbiofilms auf die Einnistung nicht auszuschließen.

Die Einnistungsexperimente wurden mit Inokulumkonzentrationen von ca.  $10^6$  KBE/ml durchgeführt. So sollte ein Einfluss der Startkonzentration auf mögliche Unterschiede im Einnistungsverhalten bei den Einnistungsexperimenten vermieden werden.

Anhand von verschiedenen Teststämmen (2 mucoide, 4 nicht-mucoide und 2 Lektin-Defekt-Mutanten) mit unterschiedlichen EPS (siehe 5.2) wurde untersucht, ob sich die Teststämmen in ihrem Einnistungs- und/oder Persistenzverhalten unterscheiden. Um das Einnistungs- und/oder Persistenzverhalten bewerten zu können, wurde eine Bezugsgröße benötigt. Das Verhältnis von *P. aeruginosa* zu den Biofilmbakterien wäre ein interessanter Parameter. Hiermit ließe sich der Anteil von *P. aeruginosa* im Vergleich zu allen vorhandene Zellen ausdrücken. Aus technischen Gründen (Lieferschwierigkeiten bei den Filtern) war es aber nicht möglich, durchgängig die Gesamtzellzahl zu bestimmen. Daher scheidet diese Bezugsgröße aus. Der HPC-Wert des Biofilms ist eine weitere mögliche Bezugsgröße. Allerdings konnte diese Bezugsgröße direkt von *P. aeruginosa* beeinflusst werden. Beobachtungen zeigten, dass in Gegenwart von *P. aeruginosa* ein bestimmter Kolonietyp auf dem R2A-Medium nicht in unmittelbarer Nachbarschaft der nicht-mucoiden *P. aeruginosa*-Stämme aufzufinden war. Da dieser Kolonietyp ein Großteil (ca. 90%) der Kolonien repräsentierte, war eine unabhängige Bestimmung des HPC-Werts nicht möglich. Des Weiteren war bei den mucoiden Stämmen eine teilweise Ablösung des Biofilms erkennbar. Dies könnten Ursachen für die unterschiedlichen Verhältniswerte von *P. aeruginosa* und HPC-Werten der Biofilme sein (Promille- bis Prozentbereich). Somit ist auch dieser Parameter für eine genaue Bewertung der Einnistung/Persistenz von *P. aeruginosa* in diesen Proben nicht unkritisch zu betrachten. Deshalb wurde das Einnistungs- und Persistenzverhalten anhand der flächenbezogenen Koloniezahl von *P. aeruginosa* (bestimmt auf CN-Agar) bewertet.

In den Einnistungsexperimenten mit den mucoiden (Alginate produzierend) Stämmen (Stamm SG81 und FRD1) unter Standardbedingungen (Vorkultur auf R2A, 2 x 3 d, 20 °C, Suspension in deionisiertem Wasser, erstellen des Inokulums in 1:100 CASO in sterilfiltriertem Trinkwasser) konnten in den Biofilmen für den Stamm SG81 direkt nach der Einnistung (0 d) zwischen  $10^5$  und  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> nachgewiesen werden. Nach 7 Tagen in Trinkwasser waren in den Biofilmen zwischen  $10^4$  bis  $10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> feststellbar. Bei dem Stamm FRD1 waren die Koloniezahlen von *P. aeruginosa* ähnlich.

Wie zuvor erwähnt (siehe 5.2.1), kann Alginate für die Bakterien einen Schutzeffekt bezüglich Kupfer haben. Deshalb sollte untersucht werden, ob die mucoiden Stämme auf dem Anzuchtsmedium R2A Alginate produzieren konnten. Dazu wurden die EPS nach 2-mal 3 Tagen auf R2A untersucht. Es stellte sich heraus, dass bei beiden mucoiden Stämmen (SG81, FRD1) noch Uronsäuren (Alginate) nachweisbar waren. Allerdings war hier eine eindeutige Aussage schwierig. Während der Anzuchtphase (3 d, R2A, 20 °C) konnten Veränderungen der Morphologie des Bakterienrasens beobachtet werden. Nach 2 Tagen war der Bakterienrasen mucoid, am dritten Tag konnte dies nicht mehr beobachtet werden. Die Analytik der EPS aus diesen beiden Proben (nach 2 d und 3 d auf R2A) zeigten deutliche Unterschiede in den Gehalten an Uronsäuren. Nach 2 Tagen auf R2A wies der Stamm SG81 einen Gehalt von ca. 90 % Uronsäure in den EPS auf, nach 3 Tagen waren es nur noch 9 %. Bei dem

Stamm FRD1 konnten nach 2 Tagen ein Anteil ca. 80 % Uronsäure an den EPS bestimmt werden, nach 3 Tagen noch ca. 33 %. Die Verringerung der Alginatmenge könnte ein Hinweis auf Alginatlyaseaktivität sein. Dass *P. aeruginosa* in der Lage ist, Alginatlyasen zu produzieren wurde schon häufiger beschrieben (z. B.: Dunne und Buckmire 1985, Boyd und Chakrabarty 1994, Rehm 1998). Für die Einnistungsexperimente wurden allerdings Einzelkolonieausstriche angefertigt. Hier zeigte sich nach 3 Tagen auf R2A eine uneinheitliche Morphologie. In dicht bewachsenen Bereichen war das mucoide Erscheinungsbild verschwunden, während in Bereichen mit Einzelkolonien noch das mucoide Erscheinungsbild zu beobachten war. Dieses Phänomen scheint aber nicht charakteristisch zu sein. Kontrolluntersuchungen auf einem anderen Medium (PIA, im Vergleich zu R2A nährstoffreich) zeigten auch nach 3 Tagen unter denselben Bedingungen die mucoide Erscheinungsform. Somit kann dieses Verhalten der beiden mucoiden *P. aeruginosa*-Stämme wahrscheinlich auf die angebotenen Nährstoffe (qualitativ oder quantitativ) zurückgeführt werden.

Anhand der EPS-Untersuchung war erkennbar, dass in den EPS der beiden mucoiden Stämme (SG81, FRD1) nach der Anzucht auf R2A Alginat vorhanden sein kann.

Stellvertretend für mucoide Stämme wurde der Stamm SG81 genauer untersucht. Hierbei sollte geklärt werden, ob dieser Stamm in der Lage sein würde, in Trinkwasserumgebung uronsäurehaltige EPS-Komponenten zu produzieren. Wurde der mucoide Stamm SG81 auf einer unbewachsenen EPDM-Oberfläche angesiedelt und 7 Tage lang deionisiertem Wasser oder Trinkwasser exponiert, konnten keine Uronsäuren (Alginat) nachgewiesen werden. Allerdings war er in den entstandenen Biofilmen in Konzentration von ca.  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> nachweisbar. Somit konnte gezeigt werden, dass sich *P. aeruginosa* SG81 auf einer unbewachsenen EPDM-Oberfläche ansiedeln und in Trinkwasser in den Biofilmen persistieren konnte, aber in den Biofilmen Uronsäuren nicht nachzuweisen waren. Auch bei der Einnistung des Stamms SG81 in Trinkwasserbiofilme konnten keine Uronsäuren in den Biofilmen (nach der Einnistung und nach 7 Tagen in Trinkwasser) nachgewiesen werden. Der Stamm SG81 scheint also weder aus Bestandteilen des EPDM, noch aus Trinkwasserinhaltsstoffen oder eingenistet im Trinkwasserbiofilm Uronsäuren in nachweisbaren Mengen zu produzieren.

Aber dennoch waren Unterschiede der mucoiden Stämme im Vergleich zu den nicht-mucoiden Stämmen zu erkennen. Es konnte beobachtet werden, dass sich von den Biofilmen, bei Einnistung der mucoiden Stämme direkt nach der Einnistung, größere Teile ablösten. Dies konnte bei der Entnahme der Coupons aus den Bechergläsern beobachtet werden. Bei den nicht-mucoiden Stämmen wurde diese Ablösung nicht in diesem Ausmaß bemerkt. Worauf diese Ablösung zurückzuführen war, konnte nicht festgestellt werden. Bei der Betrachtung der Biofilme mit eingenisteten mucoiden Stämmen, anhand einer *P. aeruginosa*-spezifischen Gen-Sonde (FISH-Technik) wurden Bereiche entdeckt, die nur sehr dünn besiedelt waren aber so gut wie keine

sondenpositiven Zellen aufwiesen. Daher könnte es sich bei der Ablösung um einen aktiven Prozess der autochthonen Biofilmpopulation handeln, um die mucoiden *P. aeruginosa*-Stämme aus dem Biofilm zu entfernen. Oder es könnte sich um einen Effekt handeln, der durch Substanzen hervorgerufen wird, die von den mucoiden Stämmen produziert werden. Stabilitätsmessungen wären an diesen Biofilmen mittels rheologischer Untersuchungen nur schwer durchführbar. Bei diesem System handelt es sich um ein doppelt elastisches System (Biofilm und EPDM). So wären resultierende Messergebnisse nicht eindeutig einem der Systeme zuzuordnen. Allerdings wurden schon rheologische Untersuchungen an Biofilmen von *P. aeruginosa* SG81 durchgeführt (z. B. Wloka et al. 2006). Des Weiteren untersuchten Towler et al. 2003 Biofilme aus gemischten Populationen. Allerdings sind bisher keine Untersuchungen an Biofilmen auf elastischen Werkstoffen mittels eines Rheometers bekannt. Interessant könnten Untersuchungen zur Enzymvisualisierung sein, um Informationen zu erhalten, ob und welche Enzyme in Bereichen aktiv sind, die eine verminderte Stabilität aufweisen. Diese könnten in Durchflusszellen durchgeführt werden, um verschiedene Scherkräfte zu simulieren.

Untersuchungen an dem Stamm PAO1 und den Lektin-Defekt-Mutanten wiesen ähnliche Koloniezahlen von *P. aeruginosa* im Biofilm auf, wie die mucoiden Stämme. Einen Effekt von Lektinen in Bezug auf die Einnistung oder Persistenz konnte nicht nachgewiesen werden. Experimente, in denen Trinkwasserbiofilme auf EPDM mit fluoreszenzmarkiertem LecB behandelt wurden, zeigten Bereiche, in denen LecB sich anlagerte. LecB sollte also in der Lage sein, PAO1-Zellen, die dieses Lektin auf der Oberfläche tragen (Tielker et al. 2005), an den Biofilm zu binden. Allerdings zeigten weder die Einnistungsversuche mit dem Hemmzucker Fucose noch die Experimente mit den Lektin-Defekt-Mutanten deutliche Unterschiede im Vergleich mit dem Stamm PAO1. Lektine von *P. aeruginosa* (LecA und LecB) sind zwar in Reinkulturen an der Biofilmbildung beteiligt (Diggel 2006, Sonawane et al. 2006, Tielker et al. 2005) aber bei der Einnistung in Trinkwasserbiofilme war keine bedeutende Funktion der Lektine erkennbar.

Auch die Möglichkeit, unterschiedliche EPS zu produzieren, hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Einnistung oder Persistenz. Die nicht-mucoiden Stämme DSM 50071, PA14, PAO1 und die spontane Revertante SG81 R1 zeigten keine eindeutigen Unterschiede in den Koloniezahlen pro cm<sup>2</sup> zu den anderen Stämmen. Welche EPS allerdings wirklich von den verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen während der Einnistung und anschließend im Biofilm produziert wurde, war nicht bekannt.

Wie bereits erwähnt, konnte der HPC-Wert direkt von den nicht-mucoiden *P. aeruginosa*-Stämmen beeinflusst werden. Wurden die Werte für das Verhältnis von *P. aeruginosa* zu den HPC-Werten aber dennoch grob betrachtet, so ließ sich abschätzen, dass direkt nach der Einnistung bei allen Stämmen, außer PAO1 und den Lektin-Defekt-Mutanten, das Verhältnis von *P. aeruginosa* zum HPC im Prozentbereich (0,4 % – 3 % ) zu erwarten war. Bei PAO1 und den Lektin-Defekt-Mutanten lag es bei bis zu 10 %. Nach 7 Tagen in Trinkwasser waren bei allen Stämmen Verhältnisse von 0,2 % bis 3 % zu beobachten. Das relativ hohe Verhältnis von PAO1 und den Lektin-Defekt-Mutanten zum HPC ist auf niedrigere HPC-Werte des Biofilms (ca.  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup>) zurückzuführen. Der Durchschnittswert des HPC lag bei ca.  $10^8$  KBE/cm<sup>2</sup>. Unter Berücksichtigung des Durchschnittswerts des HPC von ca.  $10^8$  KBE/cm<sup>2</sup> wäre auch für den Stamm PAO1 und die Lektin-Defekt-Mutanten ein Verhältniswert im einstelligen Prozent-Bereich zu erkennen. Worauf die niedrigeren HPC-Werte zurückzuführen waren, konnte nicht geklärt werden.

Auch bei der Betrachtung des Verhältnisses von *P. aeruginosa* zu den HPC-Werten zeigte sich somit kein deutlicher Unterschied im Einnistungs- und/oder Persistenzverhalten der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme.

Anhand des hier verwendeten Versuchsablaufes (Einnistung unter Verwendung einer 1:100 CASO-Lösung) konnten keine eindeutigen Unterschiede bei den *P. aeruginosa*-Stämmen nachgewiesen werden. Aber dennoch konnten verschiedene Effekte beobachtet werden. Der mucoiden *P. aeruginosa* SG81 war besser gegen inaktivierende Trinkwasserinhaltsstoffe geschützt als nicht-mucoiden Stämme. Bei vergleichbaren Koloniezahlen im Inokulum war der Stamm SG81 nach Exposition im Trinkwasser (Bakterien werden in Trinkwasser suspendiert und verbleiben darin für 1 Tag) öfter über ein Kultivierungsverfahren nachweisbar als nicht-mucoiden Stämme. Auch war der mucoiden Stamm SG81 besser gegen Kupfer geschützt als nicht-mucoiden Stämme. Des Weiteren war *P. aeruginosa* (getestet für den mucoiden SG81 und den nicht-mucoiden DSM 50071) in einem Trinkwasser aus einer Rheinhausener Hausinstallation nach 1 Tag kulturell noch nachweisbar, während in dem Trinkwasser der Duisburger Hausinstallation (Labor U123) beide Stämme inaktiviert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass sich der mucoiden Stamm SG81 (nur für diesen Stamm getestet) auf unbewachsenen EPDM-Oberflächen ansiedeln (unter Standard-Einnistungsbedingungen) und dort in Trinkwasser für mindestens 7 Tage persistieren konnte. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass *P. aeruginosa* in der Lage ist, Biofilme oder unbesiedelte Oberflächen in Trinkwassersystemen zu kolonisieren. Erforderlich hierfür ist allerdings mindestens ein Überleben in dem standortspezifischen Trinkwasser. Das Überleben von *P. aeruginosa* ist abhängig von der Wasserqualität und der Installation.



### 5.2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) in Trinkwasserbiofilmen

Mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung lassen sich Bakterienarten gezielt erkennen. Somit ist es mit dieser Methode möglich, die Anwesenheit und die räumliche Verteilung von bestimmten Bakterien zu betrachten. Bei der FISH können mittels komplementärer Gensequenzen (DNA, RNA) spezifische Ziele (Zellen) markiert werden. Diese Gen-Sequenzen sind mit Signalmolekülen (z. B.: Fluorochrome) gekoppelt. Hieraus ergeben sich die Sonden. Sonden für das gesuchte Ziel lassen sich in Veröffentlichungen (z. B. Kempf et al. 2000) und in entsprechenden Datenbanken (z. B. <http://rdp.cme.msu.edu/>) finden oder müssen selbst entwickelt werden. Ob diese dann auch für die eigentlichen Proben geeignet sind, lässt sich nur anhand von Experimenten herausfinden. Um festzustellen, ob die FISH generell bei einer Probe anwendbar ist, wird üblicherweise im Biofilmbereich die EUB338 Sonde als Positiv- und die NONEUB338 Sonde als Negativkontrolle verwendet. Die eigentliche Sonde für den Zielorganismus wird zuerst an Reinkulturen des Zielorganismus und anschließend an Mischkulturen (andere, nicht sondenspezifische Mikroorganismen in An- und Abwesenheit des Zielorganismus) getestet. Kommt es zu keinen erkennbaren unspezifischen Bindungen (falsch positive oder falsch negative) der Sonde, sind stringente Bedingungen nachgewiesen und die Sonde kann für die entsprechende Fragestellung verwendet werden. Bei der verwendeten Psae-16S-182-Sonde konnten mit der verwendeten Prozedur (Hybridisierung 46 °C, 90 min) keine unspezifischen Bindungen bei den Trinkwasserbiofilmen beobachtet werden. Die getesteten *P. aeruginosa*-Stämme DSM 50071, PA14, PAO1, FRD1, SG81 und SG81 R1 waren eindeutig mit dieser Sonde nachweisbar. Somit war die Sonde Psae-16S-182 für die Probenmatrix Trinkwasserbiofilm/*P. aeruginosa* geeignet.

#### 5.2.3.1 FISH bei Bakterien-Suspensionen

Um die eigentliche Zahl an Zielorganismen (*P. aeruginosa*) in einer Probe zu bestimmen, ist der kulturelle Nachweis auf Selektivmedien nicht ausreichend. Selektivmedien bedeuteten Stress für den Zielorganismus. Auch besteht die Möglichkeit der subletalen Schädigung oder dass Organismen in den "viable-but-not-culturable"-Zustand (VBNC) übergehen. Im Zustand des VBNC ist es nicht möglich, die potentiell vermehrungsfähigen Mikroorganismen anhand von Kultivierungsmethoden nachzuweisen (siehe 5.2.1). Deshalb sollte versucht werden, die Zielorganismen mittels fluoreszenzmarkierter Oligonukleotid-Sonden aufzuspüren und gegebenenfalls zu quantifizieren.

Die bisher häufig in der Literatur angeführte Methode auf Objektträgern (z. B.: Szewzyk et al. 1994, Langendijk et al. 1995 Goncalves et al. 2006, Wellinghausen et al. 2005) bot einen hohen Probendurchsatz bei vergleichsweise niedrigem Arbeitsaufwand. Nachteilig war aber der nicht abzuschätzende Verlust von

Probenmaterial während der Prozedur. Die Bakterienanreicherung durch Zentrifugation, die Fixierung/Dehydratisierung (ethanolische Reihe) und diverse Waschschrte konnten zu einer Verzerrung des Verhältnisses des Zielorganismus zur Gesamtpopulation führen. Außerdem war es sehr schwierig, das Verhältnis Gesamtzellzahl und sondenpositive bei geringem Anteil des Zielorganismus der Sonde zu bestimmen. Wie schon in Abb. 62 erkennbar war, waren Sondensignale in Biofilmsuspensionen der 7 Tage-Biofilme hauptsächlich in Aggregaten zu finden. Mit dieser Methode ist zwar ein qualitativer Nachweis des Zielorganismus möglich, aber eine eindeutige Quantifizierung ist so nicht möglich.

Um einen Verlust von Zellen während der FISH-Prozedur weitestgehend auszuschließen und Proben ggf. zu konzentrieren, wurde die gesamte Prozedur auf einem Polycarbonatfilter durchgeführt (siehe 3.3.5.3). Damit eine direkte Quantifizierung erfolgen konnte, war es von Interesse, dass die Zellen auf dem Filter verblieben. Allerdings konnte eine Umverteilung der Zellen nicht ausgeschlossen werden. Während der Übersichtung des Filters mit Lösungen sind die Zellen sehr empfindlich gegenüber Strömungseinflüssen oder Abschwemmung. Es konnte zu einer Ansammlung von Zellen in bestimmten Bereichen kommen oder zu Zellaggregation bei zu hoher Filterbelegung. Auch eine Hitzefixierung der Zellen bei 80 °C auf dem Filter konnte dies nicht verhindern. Die Zellaggregation bei der Fixierung konnte nicht verhindert werden. Versuche, die Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd in Suspension vorzunehmen, zeigten nicht den gewünschten Erfolg. Selbst bei permanenter Bewegung während der Fixierung war eine Zellaggregation nicht zu verhindern. Es wurden immer wieder Zellaggregate gefunden. Diese sind bei einer Quantifizierung aber hinderlich. Ein weiteres Problem stellten schwache Sondensignale da. Dies könnte auf die Sorption der Sonde an das "Absorbant Pad" zurückzuführen sein. Durch Verlagerung des "Absorbant Pad" konnte hier eine deutliche Verbesserung erzielt werden. Allerdings kann es zu Problemen kommen, wenn die Sondenlösung zu schnell durch den Filter sickert. Eine ideale Lösung hierfür konnte noch nicht gefunden werden.

Die FISH auf Filtern wurde schon auf verschiedenen Arten durchgeführt. Methodisch gibt es hier mehrere Ansätze. Zum Beispiel filtrierten Glöckner et al. (1999) die Proben auf 0,2 µm Polycarbonatfilter, fixierten die Probe auf den Filtern mit Paraformaldehyd und zerschnitten anschließend die Filter, um die Segmente auf Glas-Objektträgern zu hybridisieren. Pernthaler et al. (2002) fixierten die filtrierten Proben mit Agarose. Anschließend wurden die Filter zerschnitten und hybridisiert. Garcia-Armisen und Servais (2004) ließen Bakterien auf Filtern über 4 Stunden auf Nährmedium mit Antibiotika anwachsen und führten anschließend die Hybridisierung durch. Diese Vorgehensweise ist als "direct-viable-count" bekannt. Durch die Antibiotika können sich vermehrungsfähige Bakterien nicht teilen, aber sie vergrößern sich und sind somit von vermehrungsunfähigen Bakterien zu unterscheiden.

Eine direkte Durchführung der FISH-Prozedur in einem System ohne den Proben­träger überführen zu müssen ist bisher noch nicht beschrieben worden.

### 5.2.3.2 FISH im Biofilm

Um die räumliche Verteilung von bestimmten Bakterien zu betrachten, ist es von Interesse, die Zielorganismen direkt im Biofilm darzustellen. Um *P. aeruginosa* mittels FISH direkt in Biofilmen darstellen zu können wurden verschiedene Methoden ausprobiert. Es stellte sich heraus, dass eine ethanolische Vorbehandlung notwendig war, um ein Sondersignal innerhalb von einer 3-stündigen Hybridisierung zu erhalten. Allerdings war eine Totaldehydratisierung (Behandlung mit 96% Ethanol) des Biofilms nicht zwingend notwendig. Eine Behandlung mit einer 1:1 Mischung aus Ethanol und Puffer (PBS) war ausreichend. Kontrolluntersuchungen mit einer Bakterien­sonde (EUB338) als Positivkontrolle und einer Sonde (NONEUB338) als Negativkontrolle zeigten, dass die Prozedur erfolgreich angewendet werden konnte. Wurden Biofilme auf diese Weise hybridisiert, konnten klare Sondersignale der *P. aeruginosa*-Sonde (Psae 16S-182) erhalten werden. Beide Methoden (Totaldehydratisierung und die Behandlung mit einer 1:1 Mischung aus Ethanol und PBS) waren praktikabel.

Die Anwendung der FISH in nicht total dehydratisierten Biofilmen wurde bisher kaum beschrieben. Thurnheer und Gmür (2004) verwendeten eine ähnliche Prozedur für die Hybridisierung von Mischkulturbiofilmen. Dazu wurden Biofilme aus 6 verschiedenen Bakterienarten des Mundraums auf Hydroxyapatit angezüchtet. Für die Permeabilisierung wurde allerdings keine 1:1 Mischung aus Ethanol und PBS verwendet, sondern eine Lysozymbehandlung. Die Hybridisierung erfolgte ebenfalls für 3 Stunden, allerdings wurden andere Sonden verwendet.

Beide Prozeduren (Totaldehydratisierung und die Behandlung mit einer 1:1 Mischung aus Ethanol und PBS) konnten erfolgreich angewendet werden, um *P. aeruginosa* in Biofilmen zu lokalisieren. Somit standen, je nach Fragestellung, 2 Methoden zur Auswahl. Bei der Totaldehydratisierung wurde der Biofilm sehr kompakt und ein Großteil der räumlichen Struktur ging verloren. Von Vorteil war allerdings, dass aufgrund der Kompaktheit die Zielorganismen (falls vorhanden) gut gefunden werden konnten. Eine Suche im dreidimensionalen Raum war kaum erforderlich. Dies war bei einer geringen Anzahl an sondenpositiven Zellen im Vergleich zu der Gesamtzell­färbung nützlich. Bei so einem Verhältnis (viele Zellen, wenige sondenpositive Zellen) war es bei der anderen Methode (Behandlung mit einer 1:1 Mischung aus Ethanol und PBS) mit viel Aufwand verbunden, die Sondersignale zu finden. Hier musste nicht nur die Fläche, sondern das Volumen durchsucht werden. Bei der mikroskopischen Betrachtung mit 1000-facher Vergrößerung, einer Fläche von ca. 15 cm<sup>2</sup> und einem Gesichtsfeld ca. 10<sup>4</sup> µm<sup>2</sup> ergaben sich ca. 500.000 Gesichtsfelder. Bei einer Biofilmdicke von ca. 80 µm war viel Zeit (mehrere Stunden) notwendig, um eine Übersicht über die Probe zu erhalten. Aufgrund des hohen Zeitaufwandes war ein Verlust an Fluoreszenzintensität durch die andauernde

Bestrahlung mit UV- oder Laser-Licht nicht auszuschließen. Aufgrund dessen und der besseren Handhabbarkeit der total dehydratisierten Proben (sie konnten nach der Fixierung gelagert werden) wurde ein Großteil der Untersuchungen mit diesem Verfahren durchgeführt.

Beide Verfahren (Totaldehydratisierung und die Behandlung mit einer 1:1 Mischung aus Ethanol und PBS) waren geeignet, um *P. aeruginosa* direkt in Biofilmen darzustellen und die räumliche Verteilung der Bakterien sichtbar zu machen.

Untersuchungen von Biofilmen, in die *P. aeruginosa* eingenistet wurde zeigten, dass es möglich war, die Sondensignale gut zu erkennen. Dabei war eine inhomogene Verteilung der Sondensignale direkt nach der Einnistung erkennbar (siehe Abb. 63). Hierfür sind 2 Erklärungen möglich. Entweder gibt es Bereiche in dem Biofilm, indem sich *P. aeruginosa* bevorzugt einnistet, oder dies sind Bereiche, in denen sich *P. aeruginosa* vermehren kann. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen wurde versucht, *P. aeruginosa* DSM 50071 unter verschiedenen Bedingungen einzunisten. Hierfür wurde ein Ansatz nach Standardvorgehensweise (1:100 CASO in Trinkwasser) untersucht. Hierbei konnte in den Trinkwasserbiofilmen *P. aeruginosa* mit ca.  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> kulturell nachgewiesen werden. Bei dem Ansatz mit Trinkwasser konnte nach der Einnistung *P. aeruginosa* in der Animpfsuspension, über das Kultivierungsverfahren, nicht mehr nachgewiesen werden, aber in den Biofilmen konnte *P. aeruginosa* mit ca. 30 KBE/cm<sup>2</sup> bestimmt werden. In dem Ansatz mit deionisiertem Wasser konnte *P. aeruginosa* in der Animpfsuspension in nahezu unveränderter Koloniezahl nachgewiesen werden. In den Biofilmen waren ca.  $10^3$  KBE/cm<sup>2</sup> nachweisbar. In den FISH-Untersuchungen zeigte sich, dass *P. aeruginosa* nur bei dem Standardansatz (1:100 CASO in Trinkwasser) in den Biofilmen eindeutig nachgewiesen werden konnte. Im Ansatz mit Trinkwasser und im Ansatz mit deionisiertem Wasser war er nicht eindeutig nachweisbar. Im dem Ansatz mit deionisiertem Wasser war *P. aeruginosa* mit ca.  $10^3$  KBE/cm<sup>2</sup> in den Biofilmen bestimmbar, somit hätte mindestens alle 10 Gesichtsfelder ein sondenpositives Bakterium (bei homogener Verteilung) auffindbar sein sollen. Da eine homogene Verteilung nicht erwartet werden konnte, ist der nicht eindeutige Nachweis mit der FISH von *P. aeruginosa* in diesen Proben erklärbar.

Es zeigte sich, dass, obwohl *P. aeruginosa* DSM 50071 in deionisiertem Wasser nach der Einnistung in nahezu unveränderter Koloniezahl nachgewiesen werden konnte, er kaum (ca.  $10^3$  KBE/cm<sup>2</sup>) im Biofilm auffindbar war. Dieser Befund ließe den Schluss zu, dass sich *P. aeruginosa* möglicherweise in einem Zustand der Vermehrung befinden muss, um sich in Trinkwasserbiofilme einnisten zu können. Die Frage der inhomogenen Verteilung von *P. aeruginosa* bei der Einnistung in Trinkwasserbiofilme konnte so nicht geklärt werden.

Eine Abhängigkeit der Einnistung vom physiologischen Zustand ließen auch in Einnistungsexperimente mit verschiedenen Konzentrationen in den Animpfsuspensionen erkennen. Bei Startkonzentrationen von *P. aeruginosa* mit ca.  $10^4$  KBE/ml wurden *P. aeruginosa* im Biofilm nach Beimpfung (0 d) mit ca.  $10^4$  KBE/cm<sup>2</sup> gefunden. Bei einer Startkonzentration von ca.  $10^5$  KBE/ml

ließen sich *P. aeruginosa* im Biofilm nach Beimpfung (0 d) mit ca.  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> nachweisen. In beiden Ansätzen erhöhte sich die Koloniezahl von *P. aeruginosa* in den Animpfsuspensionen um mindestens 1 log-Stufe (Vermehrung von *P. aeruginosa*). Bei einem Ansatz mit einer Startkonzentration von ca.  $3,4 \times 10^6$  KBE/ml an *P. aeruginosa* war zwar eine Zunahme der Gesamtzellzahl erkennbar (ca. 2 log-Stufen), aber die Koloniezahl von *P. aeruginosa* sank auf ca.  $4,2 \times 10^5$  KBE/ml. Dabei waren in 2 Biofilmen  $1,0 \times 10^5$  bzw.  $2,5 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> an *P. aeruginosa* und in einem Biofilm  $5,5 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> an *P. aeruginosa* nachweisbar. Hieran war erkennbar, dass eine höher konzentrierte Animpfsuspension nicht zwingend zu einer höheren Zahl von *P. aeruginosa* im Biofilm führte. Die Vermehrung der Zellen schien auch hier einen Einfluss auf die Einnistung zu haben.

#### 5.2.4 EPS-Isolierung von Biofilmen mit eingenistetem *P. aeruginosa*

Wie gezeigt wurde, war es möglich verschiedene *P. aeruginosa*-Stämme in Trinkwasserbiofilme einzunisten (siehe 4.2.3). Diese persistierten dort für mindestens 7 Tage. Ein Einfluss der EPS dieser Stämme auf das Einnistungs- und/oder Persistenzverhalten konnte über die mikrobiologischen Parameter (GZZ, HPC, Koloniezahl *P. aeruginosa*) nicht erkannt werden. Um den Einfluss von *P. aeruginosa* auf die EPS von Trinkwasserbiofilmen zu untersuchen, wurden EPS mit der entwickelten Methode (Dowex miniaturisiert unter Verwendung eines Vortex (DV), siehe 3.2.2.3) aus den Trinkwasserbiofilmen mit eingenistetem *P. aeruginosa* isoliert.

Korreliert man die EPS-Daten (Kohlenhydrate, Proteine) von Trinkwasserbiofilmen mit mikrobiologischen Parametern (Gesamtzellzahl, Koloniezahl), so konnte eine Tendenz in den EPS-Werten in Abhängigkeit von *P. aeruginosa* vermutete werden. In je 3 Biofilmen nach der Einnistung war bei dem mucoiden Stamm SG81 erkennbar, dass dort höhere Proteinwerte (6,7 bis 11,8 µg/cm<sup>2</sup>) als bei dem nicht-mucoiden DSM 50071 (2,6 bis 4,8 µg/cm<sup>2</sup>) nachgewiesen werden konnten. Die Koloniezahlen für *P. aeruginosa* in den Biofilmen waren ähnlich (ca.  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup>). Ein anderer Versuch zeigte, dass der Biofilm nach der Einnistung (6,6 µg/cm<sup>2</sup>) ohne *P. aeruginosa* (nur in 1:100 CASO) einen geringeren Proteinwert zeigt, als ein Biofilm mit *P. aeruginosa* DSM 50071 (10,4 µg/cm<sup>2</sup>) oder PAO1 (10 µg/cm<sup>2</sup>). Die Kohlenhydratwerte waren in allen 3 Biofilmen ähnlich (ca. 5 µg/cm<sup>2</sup>). Nach 7 Tagen waren keine eindeutigen Unterschiede erkennbar.

Anhand dieser Ergebnisse war ein Einfluss von *P. aeruginosa* auf die EPS-Zusammensetzung der Biofilme nicht auszuschließen. Dieser Einfluss konnte hauptsächlich bei den Proteinen beobachtet werden.

### 5.3 Fazit

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von EPS auf das Einnistungs- und/oder Persistenzverhalten von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme zu untersuchen.

Um EPS aus Biofilmen zu isolieren existiert bisher keine perfekte Methode. Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die Verwendung des Kationentauschers Dowex eine höhere Ausbeute an EPS bei Proben unterschiedlicher Herkunft, im Vergleich zu einer Dispergierungsmethode, erzielt werden konnte. Die EPS-Isolierung mit Dowex konnte erfolgreich miniaturisiert werden und ließ sich so auf Trinkwasserbiofilme anwenden. Zuvor wurden noch keine Methoden der EPS-Isolierung an solchen Proben untersucht. Anhand der Isolierung und Analyse von EPS aus Trinkwasserbiofilmen, vor und nach Einnistung von *P. aeruginosa*, konnte eine Veränderung in den EPS der Trinkwasserbiofilme, hauptsächlich ein Anstieg des Proteingehaltes, festgestellt werden. Des Weiteren war eine mechanische Destabilisierung der Trinkwasserbiofilme durch mucoide *P. aeruginosa*-Stämme zu beobachten. Aus diesen Untersuchungen lässt sich der Schluss ziehen, dass *P. aeruginosa* die EPS von Trinkwasserbiofilmen beeinflussen kann.

Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass EPS das Einnistungsverhalten von Bakterien in Trinkwasserbiofilmen beeinflussen können. Es konnte zwar noch nicht eindeutig nachgewiesen werden, dass die EPS von *P. aeruginosa* die Einnistung direkt beeinflussen, jedoch waren Unterschiede zwischen mucoiden und nicht-mucoiden Stämmen erkennbar. Hierbei waren Unterschiede in der Toleranz gegen Kupfer und bezüglich des Überlebens in Trinkwasser zu beobachten. Aus diesen Befunden lässt sich schließen, dass die EPS von *P. aeruginosa* doch einen Einfluss, zumindest auf das Überleben in Trinkwasser, haben können und somit möglicherweise auch auf die Einnistung. Ob ein Überleben alleine aber ausreichend ist, damit sich *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme einnisten, oder sogar vermehren kann, ist nicht eindeutig geklärt. Untersuchungen zeigten, dass sich *P. aeruginosa* im Hungerzustand nur in geringen Mengen in einen Trinkwasserbiofilm einnistete. Somit ist der physiologische Zustand ein weiterer Faktor, der die Einnistung beeinflussen kann.

Die EPS der Trinkwasserbiofilme scheinen einen Einfluss auf die Einnistung von *P. aeruginosa* zu haben. Experimente mit Gen-Sonden zeigten eine heterogene Verteilung der eingenisteten *P. aeruginosa*-Bakterien. Dies ist ein Hinweis, dass es Bereiche in den Trinkwasserbiofilmen gibt, die bevorzugt von *P. aeruginosa* kolonisiert werden.

Um die Einnistung von pathogenen Mikroorganismen in Biofilme zu verstehen, sind noch weitere Untersuchungen notwendig. Diese Arbeit zeigt Aspekte auf, die bei solchen Untersuchungen berücksichtigt werden sollten. Die Wechselwirkung von pathogenen Mikroorganismen mit dem Wasser und seinen Inhaltsstoffen sowie dem Biofilm werden Gegenstand weiterer Forschungen sein.

## 5.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen mehrere Faktoren auf, die die Einnistung von *P. aeruginosa* und möglicherweise auch anderer pathogener Mikroorganismen in Biofilme beeinflussen.

Ein Aspekt dabei ist das Trinkwasser. Hierbei zeigte sich eine inaktivierende Wirkung von Kupfer auf *P. aeruginosa*. Diese inaktivierende Wirkung ist ein interessanter Forschungsaspekt, da sich hier die Frage stellt, ob die Bakterien abgetötet werden oder nur in einen VBNC-Zustand übergehen. Im VBNC-Zustand wären sie für die Nachweisverfahren mittels Kultivierung nicht zugänglich, stellten aber weiter eine potentielle Gefahr im Trinkwasser da. In diesem Bereich wurden bereits Untersuchungen (Masterarbeit Dwidjosiswojo 2008) am Biofilm Centre durchgeführt. Auch wenn *P. aeruginosa* in Wasser kulturell nachweisbar bleibt, ist dies noch nicht zwingend mit einer Einnistung in Biofilme verbunden. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu klären, unter welchen Bedingungen sich *P. aeruginosa* in Biofilme einnistet. Dazu könnten Einnistungsversuche in unterschiedlichen Suspensionsmedien in Kombination mit molekularbiologischen Untersuchungen (z. B. Gen-Expression) durchgeführt werden.

Die Frage, welche EPS im Trinkwassermilieu produziert werden und wie diese mit Trinkwasserinhaltsstoffen wechselwirken, kann Hinweise auf die Überlebenswahrscheinlichkeit von *P. aeruginosa* im Trinkwasser liefern. Hierzu müssten die EPS isoliert und analysiert werden. Mit den EPS oder einzelnen Fraktionen aus den EPS könnten dann die Wechselwirkung mit potentiell toxischen Wasserinhaltsstoffen untersucht werden.

Auch der Einfluss von *P. aeruginosa* auf die EPS der Trinkwasserbiofilme ist ein wichtiger Aspekt. Untersuchungen über die Veränderung des Proteoms werden bereits am Biofilm Centre durchgeführt (Dissertation Michalowski in prep.).

Die Destabilisierung der EPS durch mucoide *P. aeruginosa*-Stämme ist ein weiterer Aspekt. Untersuchungen über EPS-abbauende Enzyme in destabilisierten Bereichen und deren Herkunft könnten hier zum Verständnis beitragen.

*P. aeruginosa* ist nur ein Vertreter für hygienisch relevante Organismen. Antagonismen oder Synergismen hygienisch relevanter Organismen in Trinkwasser sind möglicherweise weitere Faktoren, die Einfluss auf das Überleben und die Einnistung haben können.

## 6 Literatur

Aguilera, A.; Souza-Egipsy, V.; San Martín-Úriz, P.; Amils, R. (2008) Extraction of extracellular polymeric substances from extreme acidic microbial biofilms  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 78, S. 1079 – 1088

Al-Bakri, A. G.; Gilbert, P.; Allison, D. G. (2004) Immigration and emigration of *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* between and within mixed biofilm communities  
J. Appl. Microbiol., 96, S. 455 – 463

Alexander, E.; Pham, D.; Steck, T. R. (1999) The viable-but-nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*  
Appl. Environ. Microbiol., 65 (8), S. 3754 – 3756

Allesen-Holm, M.; Barken, K. B.; Yang, L.; Klausen, M.; Webb, J. S.; Kjelleberg, S.; Molin, S.; Givskov, M.; Tolker-Nielsen, T. (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms  
Mol. Microbiol., 59 (4), S. 1114 – 1128

Allison, D. G.; Sutherland, I. W. (1984) A staining technique for attached bacteria and its correlation to extracellular carbohydrate production  
J. Microbiol. Meth., 2, S. 93 – 99

Allison, D. G. (2003) The biofilm matrix  
Biofoul., 19 (2), S. 139 – 150

Al-Mobeireek, A.; Kambal, A.-M.; Al-Balla, S. R.; Al-Sawwaf, H.; Saleemi, S. (1998) *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized patients with infective exacerbations of bronchiectasis: clinical and research implications  
Ann. Saudi Med., 18 (5), S. 469 – 471

Amann, R.; Ludwig, W.; Schleifer, K.-H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation  
Microbiol. Rev., 59, S. 143 – 169

Amann, R.; Schleifer, K.-H. (2005) Nucleic acid probes and their application in environmental microbiology, S. 67 – 82  
In: Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd Ed., Vol. 2, Part A  
Hrsg.: Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T  
Springer

Ammor, M. S. (2007) Recent advances in the use of intrinsic fluorescence for bacterial identification and characterization  
J. Fluoresc., 17, S. 455 – 459

Andersson, S.; Rajarao, G. K.; Land, C. J.; Dalhammar, G. (2008) Biofilm formation and interactions of bacterial strains found in wastewater treatment systems  
FEMS Microbiol. Lett., 283, S. 83 – 90



- Anonym (1998) Heterotrophic Plate Count  
Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20<sup>th</sup> Edition  
S. 9-34 bis 9-42
- Aumeran, C.; Band, O.; Lesens, O.; Delmas, J.; Souweine, B.; Traoré, O. (2008) Successful control of a hospital-wide vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreak in France  
Eur. J. Clin. Microbiol., 27, S. 1061 - 1064
- Azeredo, L.; Lazarova, V.; Oliveira, R. (1999) Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: a comparative study  
Wat. Sci. Tech., 39, S. 243 – 250
- Barken, K. B.; Pamp, S. J.; Yang, L.; Gjermansen, M.; Bertrand, J. J.; Klausen, M.; Givskov, M.; Whitchurch, C. B.; Engel, J. N.; Tolker-Nielsen, T. (2008) Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms  
Environ. Microbiol., 10 (9), S. 2331 – 2343
- Bast, E. (1999) Bestimmung der Zellzahl und Zellmasse in Populationen einzelner Mikroorganismen, Kap. 9  
In: Mikrobiologische Methoden; Hrsg.: Bast, E.  
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg – Berlin
- Baty III, A. M.; Eastburn, C. C.; Diwu, Z. J.; Techkarnjanaruk, S.; Goodman, A. E.; Geesey, G. G. (2000) Differentiation of chitinase-active and non-chitinase-active subpopulations of a marine bacterium during chitin degradation  
Appl. Environ. Microbiol., 6, S. 3566 – 3573
- Baty III, A. M.; Diuw, Z. J.; Dunham, G.; Eastburn, C. C.; Geesey, G. G.; Goodman, A. E.; Suci, P. A.; Techkarnjanaruk, S. (2001) Characterization of extracellular chitinolytic activity in biofilms  
Methods Enzymol., 336, S. 279 – 301
- Beccari, M.; Mappelli, P.; Tandoi, V. (1980) Relationship between bulking and physicochemical-biological properties of activated sludge  
Biotechn. Bioeng., 12, S. 969 – 979
- Beech, I. B.; Sunner, J. A.; Hiraoka, K. (2005) Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes  
Int. Microbiol., 8, S. 157 – 168
- Behrends, H. B. (2003) *Pseudomonas* in a new hospital building  
Gesundheitswesen, 65 (12), S. 736 – 737
- Bergmans, I.; Moisiadis, P.; Huybrechts, B.; Van Meerbeek, B.; Quirynen, M.; Lambrechts, P. (2008) Effects of photo-activated disinfection on endodontic pathogens *ex vivo*  
Int. Endodont. J., 41, S. 227 – 239

- Berry, D.; Xi, C.; Raskin, L. **(2006)** Microbial ecology of drinking water distribution systems  
Curr. Op. Biotechnol., 17, S. 297 – 302
- Besemer, K.; Singer, G.; Limberger, R.; Chlup, A.-K.; Hochedlinger, G.; Hödl, I.; Baranyi, C.; Battin, T. J. **(2007)** Biophysical controls on community succession in stream biofilms  
Appl. Environ. Microbiol., 73 (15), S. 4966 – 4974
- Beveridge, T. J.; Koval, S. F. **(1981)** Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K-12  
Appl. Environ. Microbiol., 42 (2), S. 325 – 335
- Birmingham, J. J.; Hughes, N. P.; Treloar, R. **(1995)** Diffusion and binding measurement within oral biofilms using fluorescence photobleaching recovery methods  
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 350, S. 325 – 343
- Bismarck, v. P.; Schneppenheim, R.; Schumacher, U. **(2001)** Successful treatment of *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infection with a sugar solution – a case report on a lectin based therapeutic principle  
Klin. Pädiatr., 213, S. 285 – 287
- Böckelmann, U.; Manz, W.; Neu, T. R.; Szewzyk, U. **(2000)** Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates ("river snow") in the Elbe River of Germany by cultivation and molecular methods  
FEMS Microbiol. Ecol., 33, S. 157 – 170
- Bomo, A.-M.; Storey, M. V.; Ashbolt, N. J. **(2004)** Detection, integration and persistence of aeromonads in water distribution pipe systems  
J. Wat. Health, 2 (2), S. 83 – 96
- Bonner, O. D.; Smith, L. L. **(1957)** A selectivity scale for some divalent cations on Dowex 50  
J. Phys. Chem., 61 (3), S. 326 – 329
- Borkow, G.; Gabbay, J. **(2005)** Copper as a biocidal tool  
Curr. Med. Chem., 12, S. 2163 – 2175
- Boyd, A.; Chakrabarty, A. M. **(1994)** Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*  
Appl. Environ. Microbiol., 60 (7), S. 2355 – 2359
- Boyd, A.; Chakrabarty, A. M. **(1995)** *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide  
J. Ind. Microbiol., 15, S. 162 – 168
- Breeveld, M. W.; Zevenhuizen, T. M.; Zehnder, A. J. B. **(1990)** Osmotically induced oligo- and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti* Su47  
J. Gen. Microbiol., 136, S. 2511 – 2519

- Bressler, D. (2002) Mikrobiologisch-biochemische Charakterisierung von Trinkwasserbiofilmen und Untersuchung zu ihrer Rolle als Habitat für hygienisch relevante Bakterien  
Diplomarbeit, Universität Duisburg-Essen
- Bressler, D.; Balzer, M.; Dannehl, A.; Flemming, H.-C.; Wingender, J. (in prep.) Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking-water biofilms on elastomeric material
- Broekman, S. (2007) Etablierung der Methodik zur Darstellung des extrazellulären Proteoms in Biofilmen eines mucoiden Stammes von *Pseudomonas aeruginosa*  
Dissertation, Universität Duisburg-Essen
- Brown, M. J.; Lester, J. N. (1980) Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods  
Appl. Environ. Microbiol., 40, S. 179-185
- Brunk, C. F.; Jones, K. C.; James, T. W. (1979) Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates  
Anal. Biochem., 92, S. 497 – 500
- Bryers, J. D. (2008) Medical biofilms  
Biotechnol. Bioeng., 100 (1), S. 1 – 18
- Buckmire, F. L. A. (1984) Influence of nutrient media on the characteristics of the exopolysaccharide produced by three mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains  
Microbios, 41, S. 49 – 63
- Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lawrence, J. R. (1992) Confocal laser scanning microscopy and digital image analysis in microbial ecology  
Adv. Microb. Ecol., 12, S. 1 – 67
- Camper, A. K.; Jones, W. L.; Hayes, J. T. (1996) Effect of growth conditions and substratum composition on the persistence of coliforms in mixed-population biofilms  
Appl. Environ. Microbiol., 62 (11), S. 4014 – 4018
- Cañas, B.; López-Ferrer, D.; Ramos-Fernández, A.; Camafeita, E.; Calvo, E. (2006) Mass spectrometry technologies for proteomics  
Brief. Fuct. Gen. Prot., 4 (4), S. 295 – 320
- Carmeli, Y. (2008) Strategies for managing today's infections  
J. Comp. Europ. Soc. Clin. Microbiol. Inf. Dis., 14 (Sup. 3), S. 22 – 31
- Chaidez, C.; Soto, M.; Martinez, C.; Keswick, B. (2008) Drinking water microbiological survey of the northwestern state of Sinaloa, Mexico  
J. Wat. Health, 6 (1), S. 125 – 129
- Chandra, J.; Kuhn, D. M.; Mukherjee, P. K.; Hoyer, L. L.; McCormick, T.; Ghannoum, M. A. (2001) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance  
J. Bacteriol., 183, S. 5385 – 5394

- Characklis, W. G. (1990) Biofilm processes, S. 195 – 232  
In: Biofilms, Hrsg.: Characklis, W. G.; Marshall, K. C.  
John Wiley & Sons, New York
- Chen, Y.; Sharma-Shivappa, R. R.; Keshwani, D.; Chen, C. (2007) Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production  
Appl. Biochem. Biotechnol., 142, S. 276 – 290
- Cheng, K.-K.; Zhang, J.-A.; Ping, W.-X.; Ge, J.-P.; Zhou, Y.-J.; Ling, H.-Z.; Xu, J.-M. (2008) Sugarcane bagasse mild alkaline/oxidative pretreatment for ethanol production by alkaline recycle process  
Appl. Biochem. Biotechnol., 151, 43 – 50
- Chicote, E.; García, A. M.; Moreno, D. A.; Sarró, M. I.; Lorenzo, P. I.; Montero, F. (2005) Isolation and identification of bacteria from spent nuclear fuel polls  
J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 32, S. 155 – 162
- Christensen, B. E.; Kjosbakken, J.; Smidsrød, O. (1985) Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine, periphytic *Pseudomonas* sp. strain NCMB 2021  
Appl. Environ. Microbiol., 50, S. 837 – 845
- Chung, Y.-C.; Neethling, J.B. (1989) Microbial activity measurements for anaerobic sludge digestion  
J. Water Poll. Contr. Fed., 61, S. 343 – 349
- Comte, S.; Guibaud, G.; Baudu, M. (2008) Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) towards Cd, Cu and Pb for different pH values  
J. Haz. Mat., 151, S. 185 – 193
- Conti, E.; Flaibani, A.; O'Regan, M.; Sutherland, I. W. (1994) Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*: production and properties  
Microbiol., 140, S. 1125 – 1132
- Costerton, J. W.; Irvin, R. T.; Cheng, K.-J. (1981) The bacterial glycocalyx in nature and disease  
Annu. Rev. Microbiol., 35, S. 299 – 324
- Costerton, J. W.; Cheng, K.-J.; Geesey, G. G.; Ladd, T. I.; Nickel, J. C.; Dasgupta, M.; Marrie, T. J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease  
Ann. Rev. Microbiol., 41, S. 435 – 464
- Dalhoff, A. (1987) *Pseudomonas aeruginosa* als Erreger opportunistischer Infektionen  
Infect., 15 (1), S 69 – 72
- Davey, M. E.; O'Toole, G. A. (2000) Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics  
Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64 (4), S. 847 – 867

- Dazzo, F. B.; Wright, S. F. (1996) Production of anti-microbial antibodies and their use in immunofluorescence microscopy, Kap. 4.1.2, S. 1 – 27  
In: Molecular microbial ecology manual  
Hrsg.: Akkermans, A. D. L.; van Elsas, J. D.; de Bruijn, F. J.  
Kluwer, Dordrecht
- Delden, v. C. (2004) Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*, Kap. 1, S. 4 – 45  
In: *Pseudomonas*, Vol. 2 Virulence and Gene Regulation, Hrsg.: Ramos, J.-L.  
Kluwer Academic / Plenum Publisher New York
- Deming, J. W.; Baross, J. A. (1986) Solid medium for culturing Black Smoker bacteria at temperatures to 120°C  
Appl. Environ. Microbiol., 51 (2), S. 238 – 243
- Denkhaus, E.; Meisen, S.; Telgheder, U.; Wingender, J (2007) Chemical and physical methods for characterisation of biofilms  
Microchim. Acta, 158, S. 1 – 27
- Diggle, S. P.; Stacey, R. E.; Dodd, C.; Cámara, M.; Williams, P.; Winzer, K. (2006) The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*  
Environ. Microbiol., 8 (6), S. 1095 – 1104
- Domek, M. J.; LeChevallier, M. W.; Cameron, S. C.; McFeters, G. A. (1984) Evidence for the role of copper in the injury process of coliform bacteria in drinking water  
Appl. Environ. Microbiol., 48 (2), S. 289 – 293
- Donaldson, S. H.; Boucher, R. C. (2003) Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease  
Curr. Opin. Pulm. Med., 9, S. 486 – 491
- Döring, G. (1987) Die Bedeutung der Virulenzfaktoren von *Pseudomonas aeruginosa* für akute und chronische *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen  
Infect., 15 (1), S: 47 – 50
- Dott, W.; Schoenen, D. (1985) Qualitative und quantitative Bestimmung von Bakterienpopulationen in aquatischen Biotopen  
7. Mitteilung: Entwicklung der Aufwuchsflora auf Werkstoffen im Trinkwasser  
Zbl. Bakt. Hyg., 180, S. 436 – 447
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances.  
Anal. Chem., 28, S. 350 – 356
- Dunne, W. M. Jr.; Buckmire, F. L. (1985) Partial purification and characterization of a polymannuronic acid depolymerase produced by a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a patient with cystic fibrosis  
Appl. Environ. Microbiol., 50 (3), S. 562 – 567

Dwidjosiswojo, Z. S. M. **(2008)** Influence of copper on the viability of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking water  
Masterarbeit, Universität Duisburg-Essen

Dziuban, E. J.; Liang, J. L.; Craun, G. F.; Hill, V.; Yu, P. A.; Painter, J.; Moore, M. R.; Calderon, R. L.; Roy, S. L.; Beach, M. J. **(2006)** Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water- United States, 2003 – 2004  
MMWR, Surveillance Summeries, 55 (12), S. 1 – 30

Eckmanns, T.; Oppert, M.; Martin, M.; Amorosa, R.; Zuschneid, I.; Frei, H.; Rüden, H.; Weist, K. **(2008)** An outbreak of hospital-acquired *Pseudomonas aeruginosa* infection caused by contaminated bottled water in intensive care units  
Clin. Microbiol. Inf., 14, S. 454 – 458

Emmerichs, N. **(2004)** Untersuchung der Wechselwirkungen von Mangan- und Calciumionen mit Alginat von Algen und von verschiedenen mucoiden Stämmen des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*  
Dissertation, Universität Duisburg-Essen

Espeland, E. M.; Wetzel, R. G. **(2001)** Effects of photosynthesis on bacterial phosphatase production in biofilms  
Microb. Ecol., 42, S. 328 – 337

ESW Scientific **(2002)** Emerging waterborne pathogens in the east of Scotland water distribution system  
Web only publication, ISBN 978 0 7559 1652 8

Evans, E.; Brown, M. R. W.; Gilbert, P. **(1994)** Iron chelator, exopolysaccharide and protease production in *Staphylococcus epidermidis*: a comparative study of the effects of specific growth rate in biofilm and planktonic culture  
Microbiol., 140, S. 153 – 157

Farag, A. M.; Nimick, D. A.; Kimball, B. A.; Church, S. E.; Harper, D. D.; Brumbaugh, W. G. **(2007)** Concentrations of metals in water, sediment biofilm benthic macroinvertebrates, and fish in the Boulder River watershed, Montana, and the role of colloids in metal uptake  
Arch. Environ. Contam. Tox., 52, S. 397 – 409

Farrah, S. R.; Unz, R. F. **(1976)** Isolation of exocellular polymer from *Zoogloea* strains MP6 and 106 and from activated sludge  
Appl. Environ. Microbiol., 32, S. 33 – 37

Fass, S.; Dincher, M. L.; Reasoner, D. J.; Gatel, D.; Block, J. C. **(1996)** Fate of *Escherichia coli* experimentally injected in a drinking water distribution pilot system  
Wat. Res., 30 (9), S. 2215 – 2221

Filisetti-Cozzi, T. M. C. C.; Carpita, N. C. **(1991)** Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars  
Anal. Biochem., 197, S. 157 – 162

Flemming H.-C. (1995) Sorption sites in biofilms  
Wat. Sci. Technol., 32 (8), S. 27 – 33

Flemming, H.-C. (1998) Biofilme in Trinkwassersystemen – Teil I: Übersicht  
GWF Wasser Abwasser, 139 (13), S. 65 – 72

Flemming, H.-C.; Wingender, J. (2000) Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) –  
der Baustoff für Biofilme  
Vom Wasser, 94, S. 245 – 266

Flemming, H.-C.; Wingender, J. (2001a) Biofilme – die bevorzugte Lebensform der  
Bakterien  
Biologie in unserer Zeit, 31 (3), S. 169 – 180

Flemming, H.-C.; Wingender, J. (2001b) Relevance of microbial extracellular  
polymeric substances (EPSs)-Part II: Technical aspects  
Wat. Sci. Technol., 43 (6), S. 9 – 16

Flemming, H.-C.; Leis, A. (2002) Sorption properties of biofilms, S. 2958 – 2967  
In: Encyclopedia of Environmental Microbiology, Vol. 5, Hrsg.: Bitton, G.  
John Wiley & Sons, Inc., New York

Flemming H.-C.; Percival, S. L.; Walker, J. T. (2002) Contamination potential of  
biofilms in water distribution systems  
Wat. Sci. Technol. Wat. Sup., 2 (1), S. 271 – 280

Flemming, H.-C.; Wingender, J. (2002) Extracellular polymeric substances (EPS):  
Structural, ecological and technical aspects, S. 1223 – 1231  
In: Encyclopedia of Environmental Microbiology, Vol. 3, Hrsg.: Bitton, G.  
John Wiley & Sons, Inc., New York

Flemming, H.-C. (2003) Erfassung des Kontaminationspotentials von Biofilmen in der  
Verteilung von Trinkwasser, S. 1 – 26  
In: Erfassung des Wachstums und des Kontaminationspotentials von Biofilmen in der  
Trinkwasserverteilung, Hrsg.: Flemming, H.-C.  
IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung, Band 36

Flemming, H.-C.; Wingender, J. (2003a) Biofilms, Kap. 7, S. 209 – 245  
In: Biopolymers, Hrsg.: Steinbüchel, A.  
Wiley-VCH-Weinheim

Flemming, H.-C.; Wingender, J. (2003b) The crucial role of extracellular polymeric  
substances in biofilms, Kap. 8, S. 178 – 210  
In: Biofilms in water treatment, Hrsg.: Wuertz, S.; Bishop, P. L.; Wilderer, P. A.;  
IWA Publishing

Flemming, H.-C.; Neu, T. R.; Wozniak, D. J (2007) The EPS Matrix: The “house of  
biofilm cells”  
J. Bacteriol., 189 (22), S. 7945 – 7947

- Flemming, H.-C. (2008) Biofilms  
In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS)  
John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, DOI: 10.1002/9780470015902.a0000342.pub2
- Forster, C. F.; Clarke, A. R. (1983) The production of polymer from activated sludge by ethanolic extraction and its relation to treatment plant operation  
Wat. Poll. Control, 82, S. 430 – 433
- Forster, C. F.; Quarmby, J. (1995) The physical characteristics of anaerobic granular sludges in relation to their internal architecture  
Ant. v. Leeuwenhoek, 67, S. 103 – 110
- Francoeur, S. N.; Wetzel, R. G.; Neely, R. K. (2001) New spatially explicit method for detecting extracellular protease activity in biofilms  
Appl. Environ. Microbiol., 67 (9), S. 4329 – 4334
- Friedman, L.; Kolter, R. (2004a) Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms  
Mol. Microbiol., 51 (3), S. 675 – 690
- Friedman, L.; Kolter, R. (2004b) Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix  
J. Bacteriol., 186 (4), S. 4457 – 4465
- Frølund, B.; Griebe, T.; Nielsen, P. H. (1995) Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 43, S. 755 – 761
- Frølund, B.; Palmgren, R.; Keiding, K.; Nielsen, P. H. (1996) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin  
Wat. Res., 30 (8), S. 1749 – 1758
- Fry, J. C.; Goulder, R.; Rimes, C. A. (1985) A note on the efficiency of stomaching for the quantitative removal of epiphytic bacteria from submerged aquatic plants  
J. Appl. Bacteriol., 58, S. 113 – 115
- Gagnon, G. A.; Slawson, R. M. (1999) An efficient biofilm removal method for bacterial cells exposed to drinking water  
J. Microbiol. Meth., 34 (3), S. 203 – 214
- Garber, N.; Guempel, U.; Gilboa-Garber, N.; Doyle, R. J. (1987) Specificity of the fucose-binding lectin of *Pseudomonas aeruginosa*  
FEMS Microbiol. Lett., 48, S. 331 – 334
- Garcia-Armisen, T.; Servais, P. (2004) Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization  
J. Microbiol. Meth., 58 (2), S. 269 – 279
- Gaudy, E.; Wolfe, R. S. (1962) Composition of an extracellular polysaccharide produced by *Sphaerotilus natans*  
Appl. Microbiol., 10, S. 200 – 205



- Gehr, R.; Henry, J. G. (1983) Removal of extracellular material: techniques and pitfalls  
Wat. Res., 12, S. 1743 – 1748
- Gehrke, T.; Telegdi, J.; Thierry, D.; Sand, W. (1998) Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching  
Appl. Environ. Microbiol., 64 (7), S. 2743 – 2747
- Gehrke, T.; Hallmann, R.; Kinzler, K.; Sand, W. (2001) The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans* – a model for structure-function relationship of attached bacteria and their physiology  
Wat. Sci. Tech., 43 (6), S. 159 – 1167
- Gião, M. S.; Azevedo, N. F.; Wilks, S. A.; Vieira, M. J.; Keevil, C. W. (2008) Persistence of *Helicobacter pylori* in heterotrophic drinking-water biofilms  
Appl. Environ. Microbiol., 74 (19), S. 5898 – 5904
- Gilboa-Garber, N. (1982) *Pseudomonas aeruginosa* lectins  
Meth. Enzymol., 83, S. 378 – 385
- Gilboa-Garber, N.; Katcoff, D. J.; Garber, N. C. (2000) Identification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PA-IIL lectin gene and protein compared to PA-IL  
FEMS Immun. Med. Microbiol., 29, S. 53 – 57
- Gilligan, P. H. (1991) Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis  
Clin. Microbiol. Rev., 4 (1), S. 35 – 51
- Glöckner, F. O.; Fuchs, B. M.; Amann, R. (1999) Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization  
Appl. Environ. Microbiol., 65 (8), S. 3721 – 3726
- Goldstein, I. J.; Hayes, C. E. (1978) The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals  
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 35, S. 127 – 340.
- Gonçalves, A. B.; Santos, I. M.; Paterson, R. R. M.; Lima, N. (2006) FISH and Calcofluor staining techniques to detect *in situ* filamentous fungal biofilms in water  
Rev. Iberoam. Micol., 23, S. 194 – 198
- Gorbushina, A. A. (2007) Life on the rocks  
Environ. Microbiol., 9 (7), S. 1613 – 1631
- Grey, B.; Steck, T. R. (2001) Concentrations of copper thought to be toxic to *Escherichia coli* can induce the viable but nonculturable condition  
Appl. Environ. Microbiol., 67 (11), S. 5325 – 5327
- Grobe, S.; Wingender, J.; Trüper, H. G. (1995) Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems  
J. Appl. Bacteriol., 79, S. 94 – 102

Grobe, S. (1996) Bedeutung des extrazellulären Polysaccharids Alginat für die Resistenz aquatischer Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* gegenüber Chlor  
In: Dissertationen aus dem IWW, Band 17

Grobe, S.; Wingender, J.; Flemming, H.-C. (2001) Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water  
Int. J. Environ. Health, 204, S. 139 – 142

Grossart, H. P.; Steward, G. F.; Martinez, J.; Azam, F. (2000) A simple, rapid method for demonstrating bacterial flagella  
Appl. Environ. Microbiol., 66, S. 3632 – 3636

Grotenhuis, J. T. C.; Smit, M.; van Lammeren, A. A. M.; Stams, A. J. M.; Zehnder, A. J. B. (1991) Localization and quantification of extracellular polymers in methanogenic granular sludge  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, S. 115 – 119

Grubert, L.; Tuschewitzki, G.-J.; Pätsch, B. (1992) Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung zur mikrobiellen Besiedlung der Innenfläche von Wasseranschlussleitungen aus Polyethylen und Stahl  
Gwf Wasser/Abwasser, 133, S. 310 – 313

Gupta, A. K.; Shashi, S.; Mohan, M.; Lamba, I. M. S.; Gupta, R. (1993) Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection on a neonatal intensive care unit  
J. Trop. Ped., 39, S. 32 – 36

Gutierrez-Gonzalvez, M. G.; Armas-Portela, R.; Stockert, J. C. (1987) Differential staining of biological structures by ruthenium red  
J. Microsc., 145, S. 333 – 340

Hall-Stoodley, L.; Costerton, J. W.; Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases  
Nat. Rev. Microbiol., 2, S. 95 – 108

Hambsch, B.; Sacré, C.; Wagner, I. (2004) Heterotrophic plate count and consumer's health under special consideration of water softeners  
Int. J. Food Microbiol., 92, S. 365 – 373

Harrison, J. J.; Ceri, H.; Yerly, J.; Stremick, C. A.; Hu, Y.; Martinuzzi, R.; Turner, R. J. (2006) The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device  
Biol. Proced., 8 (1), S. 194 – 215

Hebbar, K. P.; Gueniot, B.; Heyraud, A.; Colin-Morel, P.; Heulin, T.; Blandreau, J.; Rinaudo, M. (1992) Characterization of exopolysaccharides produced by *Rhizobacteria*  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, S. 248 – 253

- Helmi, K.; Skrabber, S.; Gantzer, C.; Willame, R.; Hoffmann, L.; Cauchie, H.-M. (2008) Interactions of *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, Vaccinal Poliovirus Type 1, and Bacteriophages  $\Phi$ X174 and MS2 with a drinking water biofilm and a wastewater biofilm  
Appl. Environ. Microbiol., 74 (7), S. 2079 – 2088
- Hejzlar, J.; Chudoba, J. (1986) Microbial polymers in the aquatic environment - I: production by activated sludge microorganisms under different conditions  
Wat. Res., 20, S. 1209 – 1216
- Higgins, M. J.; Novak, J. T. (1997) Characterization of extracellular protein and its role in bioflocculation  
J. Environ. Eng., S. 479 – 485
- Hogardt, M.; Trebesius, K.; Geiger, A. M.; Hornef, M.; Rosenecker, J.; Heesemann, J. (2000) Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients  
J. Clin. Microbiol., 38 (2), S. 818 – 825
- Holloway, C. F.; Cowen, J. P. (1997) Development of a scanning confocal laser microscopic technique to examine the structure and composition of marine snow  
Limnol. Oceanogr., 42, S. 1340 – 1352
- Hood, M. A.; Schmidt, J. M. (1996) The examination of *Seliberia stellata* exopolymer using lectin assays  
Microb. Ecol., 31, S. 281 – 290
- Horan, N. J.; Eccles, C. R. (1986) Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges  
Wat. Res., 20, S. 1427 – 1432
- Huang, Z.; You, W.; Haugland, R. P.; Paragas, V. B.; Olson, N. A.; Haugland, R. P. (1993) A novel fluorogenic substrate for detecting alkaline phosphatase activity in situ  
J. Histochem. Cytochem., 41, S. 313 – 317
- Huang, C.-T.; Yu, F. P.; McFeters, G. A.; Stewart, P. S. (1995) Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection  
Appl. Environ. Microbiol., 61, S. 2252 – 2256
- Huang, C.-T.; Xu, K. D.; McFeters, G. A.; Stewart, P. S. (1998) Spatial patterns of alkaline phosphatase expression within bacterial colonies and biofilms in response to phosphate starvation  
Appl. Environ. Microbiol., 64, S. 1526 – 1531
- Huang, W. E.; Stoecker, K.; Griffiths, R.; Newbold, L.; Daims, H.; Whiteley, A. S.; Wagner, M. (2007) Raman-FISH: combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence *in situ* hybridization for the single cell analysis of identity and function  
Environ. Microbiol., 9 (8), S. 1878 – 1889

- Huang, H.-I.; Shih, H.-Y.; Lee, C.-M.; Yang, T. C.; Lay, J.-J.; Lin, Y. E. (2008) In vitro efficacy of copper and silver ions in eradicating *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*: Implications for on-site disinfection for hospital infection control  
Wat. Res., 42 (1-2), S. 73 – 80
- Huber, S. A. (2005) Origin and behaviour of non-ionic natural organic matter (NOM) in boiler feed water  
Int. Wat. Conf., IWC, Orlando, Florida
- Hwang, M. G.; Katayama, H.; Ohgaki, S. (2006) Accumulation of copper and silver onto cell body and its effect on the inactivation of *Pseudomonas aeruginosa*  
Wat. Sci. Technol., 54 (3), S. 29 – 34
- Ikeno, T.; Fukuda, K.; Ogawa, M.; Honda, M.; Tanabe, T.; Taniguchi, H (2007) Small and rough colony *Pseudomonas aeruginosa* with elevated biofilm formation ability isolated in hospitalized patients  
Microbiol. Immun., 51 (10), S. 929 – 938
- Iversen, B. G.; Jacobsen, T.; Eriksen, H.-M.; Bukholm, G.; Melby, K. K.; Nygård, K.; Aavitsland, P. (2007) An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infection caused by contaminated mouth swabs  
Clin. Inf. Dis., 44, S. 794 – 801
- Izano, E. A.; Amarante, M. A.; Kher, W. B.; Kaplan, J. B. (2008) Differential roles of Poly-N-Acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms  
Appl. Environ. Microbiol., 74 (2), S. 470 – 476
- Jackson, K. D.; Starkey, M.; Kremer, S.; Parsek, M. R.; Wozniak, D. J. (2004) Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation  
J. Bacteriol., 186 (14), S. 4466 – 4475
- Jaeger, K.-E. (1994) Extracellular enzymes of *Pseudomonas aeruginosa* as virulence factors  
Immun. Infekt., 22 (5), S. 177 – 180
- Jahn, A.; Nielsen, P. H. (1995) Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin  
Wat. Sci. Tech., 32, S. 157 – 164
- Jang, A.; Kim, S. M.; Kim, S. Y.; Lee, S. G.; Kim, I. S. (2001) Effect of heavy metals (Cu, Pb and Ni) on the compositions of EPS in biofilms  
Wat. Sci. Technol., 43 (6), S. 41 – 48
- Jann, K.; Jann, B.; Schmidt, M. A.; Vann, W. F. (1980) Structure of the *Escherichia coli* K2 capsular antigen, a teichoic acid-like polymer  
J. Bacteriol., 143, S. 1108 – 1115

Janssen, P. H.; Yates, P. S.; Grinton, B. E.; Taylor, P. M.; Sait, M. (2002) Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*  
Appl. Environ. Microbiol., 68 (5), S. 2391 – 2396

Jähn, A.; Schröder, M. W.; Fütting, M.; Schenzel, K.; Diepenbrock, W. (2002) Characterization of alkali treated flax fibres by means of FT Raman spectroscopy and environmental scanning electron microscopy  
Spectrochim. Acta Part A, A 58, S. 2271 – 2279

Jia, X. S.; Furumai, H.; Fang, H. H. P. (1996) Yields of biomass and extracellular polymers in four aerobic sludges  
Environ. Technol., 17, S. 283 – 291

Johnsen, A. R.; Hausner, M.; Schnell, A.; Wuertz, S. (2000) Evaluation of fluorescently labelled lectins for noninvasive localization of extracellular polymeric substances in *Sphingomonas* biofilms  
Appl. Environ. Microbiol., 66, S. 3487 – 3491

Jorand, F.; Zartarian, F.; Thomas, F.; Block, J. C.; Bottero, J. Y.; Villemin, G.; Urbain, V.; Manem, J. (1995) Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs  
Wat. Res., 29, S. 1639 – 1647

Juhna, T.; Birzniece, D.; Larsson, S.; Zulenkovs, D.; Sharipo, A.; Azevedo, N. F.; Ménard-Szczebara, F.; Castagnet, S.; Féliers, C.; Keevil, C. W. (2007) Detection of *Escherichia coli* in biofilms from pipe samples and coupons in drinking water distribution networks  
Appl. Environ. Microbiol., 73 (22), S. 7456 – 7464

Juhna, T.; Birzniece, D.; Rubulis, J. (2007) Effect of phosphorus on survival of *Escherichia coli* in drinking water biofilms  
Appl. Environ. Microbiol., 73 (11), S. 3755 – 3758

Junelles, A. M.; Kanouni, A. E.; Petitdemange, H.; Gay, R. (1989) Influence of acetic and butyric acid addition on polysaccharide formation by *Clostridium acetobutylicum*.  
J. Ind. Microbiol., 4, S. 121 – 125

Kalmbach, S.; Manz, W.; Szewzyk, U. (1997) Dynamics of biofilm formation in drinking water: phylogenetic affiliation and metabolic potential of single cells assessed by formazan reduction and in situ hybridization  
FEMS Microbiol. Lett., 22, S. 265 – 279

Karlsson, T.; Persson, P.; Skyllberg, U. (2006) Complexation of copper (II) in organic soils and in dissolved organic matter – EXAFS evidence for chelate ring structures  
Environ. Sci. Technol., 40, S. 2623 – 2628

Karlyshev, A. V.; Wren, B. W. (2001) Detection and initial characterization of novel capsular polysaccharide among diverse *Campylobacter jejuni* strains using Alcian blue dye  
J. Clin. Microbiol., 39, S. 279 – 284

- Karapanagiotis, N. K.; Rudd, T.; Sterritt, R. M.; Lester, J. N. (1989) Extraction and characterisation of extracellular polymers in digested sewage sludge  
J. Chem. Technol. Biotechnol., 44, S. 107 – 120
- Karthikeyan, S.; Wolfaardt, G. M.; Korber, D. R.; Caldwell, D. E. (1999) Functional and structural responses of a degradative microbial community to substrates with varying degrees of complexity in chemical structure  
Microb. Ecol., 38, S. 215 – 224
- Kawaguchi, T.; Decho, A. W. (2000) Biochemical characterization of cyanobacterial extracellular polymers (EPS) from modern marine stromatolites (Bahamas)  
Prep. Biochem. Biotechnol., 30, S. 321 – 330
- Kell, D. B.; Kaprelyants, A. S.; Weichart, D. H.; Harwood, C. R.; Barer, M. R. (1998) Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues  
Ant. v. Leeuwenhoek, 73, S. 169 – 187
- Kempf, V. A. J.; Trebesius, K.; Autenrieth, I. B. (2000) Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures  
J. Clin. Microbiol., 38 (2), S. 830 – 838
- Kennedy, A. F.; Sutherland, I. W. (1987) Analysis of bacterial exopolysaccharides  
Biotechnol. Appl. Biochem., 9, S. 12 – 19
- Kilb, B.; Lange, B.; Schaule, G.; Flemming, H.-C.; Wingender, J. (2003) Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves  
Int. J. Hyg. Environ. Health, 206, S. 563 – 573
- Kim, C. W.; Koopman, B.; Bitton, G. (1994) INT-dehydrogenase activity test for assessing chlorine and hydrogen peroxide inhibition of filamentous pure cultures and activated sludge  
Wat. Res., 28, S. 1117 – 1121
- King, R. O.; Forster, C. F. (1990) Effects of sonication on activated sludge  
Enz. Microbiol. Technol., 12, S. 109 – 115
- Kirschke, D. L.; Jones, T. F.; Craig, A. S.; Chu, P. S.; Mayernick, G. G.; Patel, J. A.; Schaffner, W. (2003) *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* contamination associated with a manufacturing defect in bronchoscopes  
New England J. Med., 348 (3), S. 214 – 220
- Klebensberger, J.; Lautenschlager, K.; Bressler, D.; Wingender, J.; Philipp, B. (2007) Detergent-induced cell aggregation in subpopulations of *Pseudomonas aeruginosa* as a preadaptive survival strategy  
Environ. Microbiol., 9 (9), S. 2247 – 2259

Korber, D. R.; Caldwell, D. E.; Costerton, J. W. (1994) Structural analysis of native and pure-culture biofilms using scanning confocal laser microscopy, S. 347 – 353  
In: Proceedings of the National Association of Corrosion Engineers (NACE), Canadian Region Western Conference, Calgary

Körstgens, V.; Flemming, H.-C.; Wingender, J.; Borchard, W. (2001) Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*  
Wat. Sci. Technol., 43 (6), S. 49 – 57

Kretschmayer, R.; Jesserer, H. (1943) Studien zur Biuretreaktion  
Zeitschr. Anal. Chem., 125 (1), S. 63 – 65

Kuhn, D. M.; Chandra, J.; Mukherjee, P. K.; Ghannoum, M. A. (2002) Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces  
Infect. Immun., 70, S. 878 – 888

Labare, M. P.; Guthrie, K.; Weiner, R. M. (1989) Polysaccharide exopolymer adhesives from periphytic marine bacteria  
J. Adhesion Sci. Technol., 3, S. 213-223

Lamont, H. C.; Silvester, W. B.; Torrey, J. G. (1988). Nile red fluorescence demonstrates lipid in the envelope of vesicles from N<sub>2</sub>-fixing cultures of *Frankia*  
Can. J. Microbiol., 34, S. 656 – 660

Langendijk, P. S.; Schut, F.; Jansen, G. J.; Raangs, G. C.; Kamphuis, G. R.; Wilkinson, M. H.; Welling, G. W. (1995) Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples  
Appl. Environ. Microbiol., 61 (8), S. 3069 – 3075

Langille, S. E.; Weiner, R. M. (1998) Spatial and temporal deposition of *Hyphomonas* strain VP-6 capsules involved in biofilm formation  
Appl. Environ. Microbiol., 64, S. 2906 – 2913

Långmark, J.; Storey, M. V.; Ashbolt, N. J.; Stenström, T.-A. (2005a) Accumulation and fate of microorganisms and microspheres in biofilms formed in a pilot-scale water distribution system  
Appl. Environ. Microbiol., 71 (2), S. 706 – 712

Långmark, J.; Storey, M. V.; Ashbolt, N. J.; Stenström, T.-A. (2005b) Biofilms in an urban water distribution system: measurement of biofilm biomass, pathogens and pathogen persistence within the Greater Stockholm area, Sweden  
Wat. Sci. Technol., 52 (8), S. 181 – 189

Larsen, P.; Olesen, B. H.; Nielsen, P. H.; Nielsen, J. L. (2008) Quantification of lipids and protein in thin biofilms by fluorescence staining  
Biofoul., 24 (4), S. 241 – 250

- Lawrence, J. R.; Wolfaardt, G. M.; Korber, D. R. (1994) Determination of diffusion coefficients in biofilms by confocal laser microscopy  
Appl. Environ. Microbiol., 60, S. 1166 – 1173
- Lawrence, J. R.; Neu, T. R.; Swerhone, G. D. W. (1998a) Application of multiparameter imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial biofilms  
J. Microbiol. Meth., 32, S. 253 – 261
- Lawrence, J. R.; Wolfaardt, G. M.; Neu, T. R. (1998b) The study of biofilms using confocal laser scanning microscopy, S. 431 – 465  
In: Digital analysis of microbes. Imaging, morphometry, fluorimetry and motility techniques and applications, Hrsg.: Wilkinson, M. H. F.; Schut, F.  
Modern microbiological methods series, Wiley, Sussex
- Lazarova, V.; Manem, J. (1995) Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment  
Wat. Res., 29 (10), S. 2227 – 2245
- Lebuhn, M.; Effenberger, M.; Garcés, G.; Gronauer, A.; Wilderer, P. A. (2004) Evaluating real-time PCR for the quantification of distinct pathogens and indicator organisms in environmental samples  
Wat. Sci. Technol., 50 (1), S. 263 – 270
- LeChevallier, M. W.; Babcock, T. M.; Lee, R. G. (1987) Examination and characterization of distribution system biofilms  
Appl. Environ. Microbiol., 53 (12), S. 2714 – 2724
- Leitão, J. H.; Sá-Correia, I. (1997) Effects of growth-inhibitory concentrations of copper on alginate biosynthesis in highly mucoid *Pseudomonas aeruginosa*  
Microbiol., 143, S. 481 – 488
- Lehtola, M. J.; Juhna, T.; Miettinen, I. T.; Vartiainen, T.; Martikainen, P. J. (2004) Formation of biofilms in drinking water distribution networks, a case study in two cities in Finland and Latvia  
J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 31 (11), S. 489 – 494
- Lehtola, M. J.; Pitkänen, T.; Miebach, L.; Miettinen, I. T. (2006) Survival of *Campylobacter jejuni* in potable water biofilms: a comparative study with different detection methods  
Wat. Sci. Technol., 54 (3), S. 57 – 61
- Lehtola, M. J.; Torvinen, E.; Kusnetsov, J.; Pitkänen, T.; Maunula, L.; von Bonsdorff, C.-H.; Martikainen, P. J.; Wilks, S. A.; Keevil, C. W.; Miettinen, I. T. (2007) Survival of *Mycobacterium avium*, *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, and Caliciviruses in drinking water-associated biofilms grown under high-shear turbulent flow  
Appl. Environ. Microbiol., 73 (9), S. 2854 – 2859
- Leriche, V.; Sibille, P.; Carpentier, B. (2000) Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms  
Appl. Environ. Microbiol., 66, S. 1851 – 1856



- Li, J.; McLellan, S.; Ogawa, S. (2006) Accumulation and fate of green fluorescent labeled *Escherichia coli* in laboratory-scale drinking water biofilters  
Wat. Res., 40 (16), S. 3023 – 3028
- Liu, Y.; Lam, M. C.; Fang, H. H. P. (2001) Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge  
Wat. Sci. Technol., 43 (6), S. 59 – 66
- Liu, H.; Fang, H. P. (2002) Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges  
J. Biotechnol., 95, S. 249 – 256
- Liu, Y.; Fang, H. H. P. (2003) Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation  
Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 33 (3), S. 237 – 273
- Loret, J. F.; Robert, S.; Thomas, V.; Cooper, A. J.; McCoy, W. F.; Lévi, Y. (2005) Comparison of disinfectants for biofilms, protozoa and *Legionella* control  
J. Wat. Health, 3 (4), S. 423 – 433
- Lottspeich, F.; Zorbas, H. (1998), Bioanalytik  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent  
J. Biol. Chem., 193, S. 265 – 275
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J (2002) Mikrobiologie (Brock), S. 564  
Hrsg.: Goebel, W.  
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg – Berlin
- Mangold, S.; Harneit, K.; Rohwerder, T.; Claus, G.; Sand, W. (2008) Novel combination of atomic force microscopy and epifluorescence microscopy for visualization of leaching bacteria on pyrite  
Appl. Environ. Microbiol., 74 (2), S. 410 – 415
- Manz, W.; Amann, R.; Ludwig, W.; Wagner, M.; Schleifer, K.-H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions  
Syst. Appl. Microbiol., 15, S. 593 – 600
- Manz, W.; Wendt-Potthoff, K.; Neu, T. R.; Szewzyk, U.; Lawrence, J. R. (1999) Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy  
Microb. Ecol., 37, S. 225 – 237

- Marshall, K. C.; Blainey, B. (1991) Role of bacterial adhesion in biofilm formation and biocorrosion, S. 8 – 45  
In: Biofouling and biocorrosion in industrial water systems  
Hrsg.: Flemming, H.-C.; Geesey, G. G.  
Springer Verlag, Heidelberg
- Marshall, K. C. (1992) Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces  
ASM News, 58, S. 202 – 207
- Matsukawa, M.; Greenberg, E. P. (2004) Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development  
J. Bacteriol., 186 (14), S. 4449 – 4456
- Mattila, K.; Carpen, L.; Hakkarainen, T.; Salkinoja-Salonen, M. S. (1997) Biofilm development during ennoblement of stainless steel in baltic sea water: a microscopic study  
Int. Biodeter. Biodegrad., 40, S. 1 – 10
- May, T. B.; Chakrabarty, A. M. (1994) Isolation and assay of *Pseudomonas aeruginosa* alginate  
Meth. Enzymol., 235, S. 295-304
- Mayer, C.; Moritz, R.; Kirschner, C.; Borchard, W.; Maibaum, R.; Wingender, J.; Flemming, H.-C. (1999) The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms  
Int. J. Biol. Macromol., 26, S. 3 – 16
- McSwain, B. S.; Irvine, R. L.; Hausner, M.; Wilderer, P. A. (2005) Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge  
Appl. Environ. Microbiol., 71 (2), S. 1051 – 1057
- Miksch, K. (1985) Auswahl einer optimalen Methodik für die Aktivitätsbestimmung des Belebtschlammes mit Hilfe des TTC-Test  
Vom Wasser, 64, S. 187 – 198
- Mikkelsen, A.; Elgsaeter, A. (1995) Density distribution of calcium-induced alginate gels. A numerical Study  
Biopol., 36, S. 17 – 41
- Minnick, M. F.; Rupp, R. A.; Spence, K. D. (1986) A bacterial-induced lectin which triggers hemocyte coagulation in *Manduca Sexta*  
Biochem. Biophys. Res. Com., 137 (2), S. 729 – 735
- Mitchell, E.; Houles, C.; Sudakevitz, D.; Wimmerova, M.; Gautier, C.; Pérez, S.; Wu, A. M.; Gilboa-Garber, N.; Imberty, A. (2002) Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung of cystic fibrosis patients  
Nat. Struc. Biol., 9 (12), S. 918 – 921

- Mittelman, M. W.; Geesey, G. G. (1985) Copper-binding characteristics of exopolymers from a freshwater-sediment bacterium  
Appl. Environ. Microbiol., 49 (4), S. 846 – 851
- Möhle, R. B.; Langemann, T.; Haesner, M.; Augustin, W.; Scholl, S.; Neu, T. R.; Hempel, D. C.; Horn, H. (2007) Structure and shear strength of microbial biofilms as determined with confocal laser scanning microscopy and fluid dynamic gauging using a novel rotating disc biofilm reactor  
Biotechnol. Bioeng., 98 (4), S. 747 – 755
- Moolenaar, R. L.; Crutcher, J. M.; San Joaquin, V. H.; Sewell, L. V.; Hutwagner, L. C.; Carson, L. A.; Robison, D. A.; Smithee, L. M. K.; Jarvis, W. R. (2000) A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmission?  
Inf. Cont. Hosp. Epidem., 21 (2), S. 80 – 85
- Morel, F. M. M.; Palenik, B. (1989) The aquatic chemistry of trace metals in biofilms, S. 289 – 300  
In: Structure and Function of Biofilms, Hrsg.: Characklis, W. G.; Wilderer, P. A.  
John Wiley & Sons
- Morgan, J. W.; Forster, C. F.; Evison, L. (1990) A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges  
Wat. Res., 24, S. 743 – 750
- Moscoso, M.; García, E.; López, R. (2006) Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: Role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion  
J. Bacteriol., 188 (22), S. 7785 – 7795
- Mulligan, C. N.; Mahmoudides, G.; Gibbs, B. F. (1989) The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*  
J. Bacteriol., 12, S. 199 – 210
- Nakamura, S.; Higashiyama, Y.; Izumikawa, K.; Seki, M.; Takeya, H.; Yamamoto, Y.; Yanagihara, K.; Miyazaki, Y.; Mizuta, Y.; Kohno, S. (2008) The roles of the quorum-sensing system in the release of extracellular DNA, lipopolysaccharide, and membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa*  
Jpn. J. Infect. Dis., 61, S. 375 – 378
- Neria-González, I.; Wang, E. T.; Ramírez, F.; Romero, J. M.; Hernández-Rodríguez, C. (2006) Characterization of bacterial community associated to biofilm of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico  
Anaerob., 12 (3), S. 122 – 133
- Neu, T. R.; Marshall, K. C. (1991) Microbial "footprints" – a new approach to adhesive polymers  
Biofoul., 3, S. 101 – 112

- Neu, T. R.; Lawrence, J. R. (1997) Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy  
FEMS Microbiol. Ecol., 24, S. 11 – 25
- Neu, T. R.; Lawrence, J. R. (1999a) In situ characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in biofilm systems, Kap. 2, S. 21 – 47  
In: Microbial Extracellular Polymeric Substances  
Hrsg.: Wingender, J.; Neu, T. R.; Flemming, H.-C.  
Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Neu, T. R.; Lawrence, J. R. (1999b). Lectin-binding analysis in biofilm systems  
Methods Enzymol., 310, S. 145 – 152
- Neu, T. R.; Swerhone, G. D. W.; Lawrence, J. R. (2001) Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems  
Microbiology, 147, S. 299 – 313
- Ng, F. M.-W.; Dawes, E. A. (1973) Chemostat studies on the regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* by citrate  
Biochem. J., 132, S. 129 – 140
- Nielsen, P. H.; Jahn, A. (1999) Extraction of EPS, Kap. 3, S. 49 – 71  
In: Microbial Extracellular Polymeric Substances  
Hrsg.: Wingender, J.; Neu, T. R.; Flemming, H.-C.  
Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Nielsen, A. T.; Tolker-Nielsen, T.; Barken, K. B.; Molin, S. (2000) Role of commensal relationship on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium  
Environ. Microbiol., 2, S. 59 – 68
- Nies, D. H. (1999) Microbial heavy-metal resistance  
Appl. Microbiol, Biotechnol, 51, S. 730 – 750
- Nilvebrant, N.-O.; Persson, P.; Reimann, A.; De Sousa, F.; Gorton, L.; Jönsson, L. J. (2003) Limits for alkaline detoxification of dilute-acid Lignocellulose hydrolysates  
Appl. Biochem. Biotechnol., 105-108, S. 615 – 628
- Nivens, D. E.; Ohman, D. E.; Williams, J.; Franklin, M. J. (2001) Role of alginate and its O-acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms  
J. Bacteriol., 183 (3), S. 1047 – 1057
- Nouwens, A. S.; Beatson, S. A.; Whitchurch, C. B.; Walsh, B. J.; Schweizer, H. P.; Mattick, J. S.; Cordwell, S. J. (2003) Proteome analysis of extracellular proteins regulated by the *las* and *rhl* quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1  
Microbiol., 149, S. 1311 – 1322

- Nuhoglu, Y.; Oguz, E.; Uslu, H.; Ozbek, A.; Ipekoglu, B.; Ocak, I.; Hasenekoglu, I. **(2006)** The accelerating effects of the microorganisms on biodeterioration of stone monuments under air pollution and continental-cold climatic conditions in Erzurum, Turkey  
Sic. Tot. Environ., 364 (1 - 3), S. 272 – 283
- Obritsch, M. D.; Fish, D. N.; MacLaren, R.; Jung R. **(2005)** Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology and treatment options  
Pharmacoth., 25 (10), S. 1353 – 1364
- Ohman, D. E.; Chakrabarty, A. M. **(1981)** Genetic mapping of chromosomal determinants for the production of the Exopolysaccharide alginate in a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate  
Infect. Immun., 33 (1), S. 142 – 148
- Oliver, J. D. **(2005)** The viable but nonculturable state in bacteria  
J. Microbiol., 43, S. 93 – 100
- O'Malley, Y. Q.; Reszka, K. J.; Spitz, D. R.; Denning, G. M.; Britigan, B. F. **(2004)** *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells  
Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 287, S. L94 – L103
- Omar, A. S.; Weckesser, J.; Mayer, H. **(1983)** Different polysaccharides in the external layers (capsule and slime) of the cell envelope of *Rhodopseudomonas capsulata* Sp11  
Arch. Microbiol., 136, S. 291 – 296
- Omoike, A.; Chorover, J. **(2004)** Spectroscopic study of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*: Aqueous chemistry and adsorption effects  
Biomacromol., 5, S. 1219 – 1230
- Ophir, T.; Gutnick, D. L. **(1994)** A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation  
Appl. Environ. Microbiol., 60 (2), S. 740 – 745
- Panknin, H.-T. **(2005)** Chirurgische Infektionen und Sepsis bei älteren Patienten: Gibt es Besonderheiten in Therapie und Prävention?  
Hartmann WundForum, 3, S. 14 – 18
- Park, S. R.; Mackay, W. G.; Reid, D. C. **(2001)** *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system  
Wat. Res., 35 (6), S. 1624 – 1626
- Park, C.; Novak, J. T. **(2007)** Characterization of activated sludge exocellular polymers using several cation-associated extraction methods  
Wat. Res., 41 (8), S. 1679 – 1688
- Paul, J. H.; Jeffrey, W. H. **(1985)** Evidence for separate adhesion mechanisms for hydrophilic and hydrophobic surfaces in *Vibrio proteolytica*  
Appl. Environ. Microbiol., 50, S. 431 – 437

- Pavoni, J. L.; Tenney, M. W.; Echelberger, W. F. (1972) Bacterial exocellular polymers and biological flocculation  
J. Wat. Poll. Control Fed., 44, S. 414 – 431
- Pedersen, K. (1990) Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water  
Wat. Res., 24, S. 239 – 243
- Pehlivan, E.; Altun, T. (2006) The study of various parameters affecting the ion exchange of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  from aqueous solution on Dowex 50W synthetic resin  
J. Haz. Mater., 134 (1-3), S. 149 – 156
- Pelkonen, S.; Häyrynen, J.; Finne, J. (1988) Polyacrylamide gel electrophoresis of capsular polysaccharides of *Escherichia coli* and other bacteria  
J. Bacteriol., 170, S. 2646 – 2653
- Percival, S. L.; Knapp, J. S.; Edyvean, R.; Wales D. S (1998) Biofilm development on stainless steel in mains water  
Wat. Res., 32 (1), S. 243 – 253
- Percival, S. L.; Walker, J. T.; Hunter, P. R. (2000) Microbiological aspects of Biofilms and drinking water, Kap. 7 und 8, S. 85 – 155  
CRC Press LCC
- Pernthaler, A.; Pernthaler, J.; Amann, R. (2002) Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria  
Appl. Environ. Microbiol., 68 (6), S. 3094 – 3101
- Petry-Hansen, H.; Steele, H.; Grooters, M.; Wingender, J.; Flemming, H.-C. (2006) Faecal contamination indicator organisms in slow sand filters, S. 143 – 151  
In: Recent progress in slow sand and alternative biofiltration process  
Hrsg.: Gimbel, R.; Graham N. j. D.; Collins, m. R.  
IWA Publishing
- Platt, R. M.; Geesey, G. G.; Davis, J. D.; White, D. C. (1985) Isolation and partial chemical analysis of firmly bound exopolysaccharide from adherent cells of a freshwater sediment bacterium  
Can. J. Microbiol., 31, S. 675 – 680
- Plotnikova, J. M.; Rahme, L. G.; Ausubel, F. M. (2000) Pathogenesis of the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in Arabidopsis  
Plant Phys., 124, S. 1766 – 1774
- Porter, K. G.; Feig, Y. S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora  
Limnol. Oceanogr., 25 (5), S. 943 – 948

- Priester, J. H.; Horst, A. M.; Van De Werfhorst, L. C.; Saleta, J. L.; Mertes, L. A. K.; Holden, P. A. (2007) Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy  
J. Microbiol. Meth., 68, S. 577 – 587
- Prince, A. (1992) Adhesins and receptors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with infection of the respiratory tract  
Microbiol. Path., 13, S. 251 – 260
- Pryor, M.; Springthorpe, S.; Riffard, S.; Brooks, T.; Huo, Y.; Davis, G.; Satter, S. A. (2004) Investigation of opportunistic pathogens in municipal drinking water under different supply and treatment regimes  
Wat. Sci. Technol., 50 (1), S. 83 – 90
- Quarmby, J.; Forster, C. F. (1995) An examination of the structure of UASB granules  
Wat. Res., 11, S. 2449 – 2454
- Quelas, J. I.; López-García, S. L.; Casabuono, A.; Althabegoiti, M. J.; Mongiardini, E. J.; Pérez-Giménez, J.; Couto, A.; Lodeiro, A. R. (2006) Effects of N-starvation and C-source on *Bradyrhizobium japonicum* exopolysaccharide production and composition, and bacterial infectivity to soybean roots  
Arch. Microbiol., 186, S. 119 – 128
- Quintero, E. J.; Weiner, R. M. (1995) Evidence for the adhesive function of the exopolysaccharide of *Hyphomonas* strain MHS-3 in its attachment to surface  
Appl. Environ. Microbiol., 61, S. 1897 – 1903
- Qureshi, F. M.; Badar, U.; Ahmed, N. (2001) Biosorption of copper by a bacterial biofilm on a flexible polyvinyl chloride conduit  
Appl. Environ. Microbiol., 67 (9), S. 4349 – 4352
- Rahman, M. M.; Guard-Petter, J.; Asokan, K.; Carlson, R. W. (1997) The structure of the capsular polysaccharide from a swarming strain of pathogenic *Proteus vulgaris*  
Carbohydr. Res., 301, S. 213 – 220
- Rahme, L. G.; Stevens, E. J.; Wolfort, S. F.; Shao, J.; Tompkins, R. G.; Ausubel, F. M. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals  
Science, 268, S. 1899 – 1902
- Ramaswamy, S.; Dworkin, M.; Downard, J. (1997) Identification and characterization of *Myxococcus xanthus* mutants deficient in Calcofluor White binding  
J. Bacteriol., 179, S. 2863 – 2871
- Rao, P.; Pattabiraman, T. N. (1989) Reevaluation of the phenol-sulfuric acid reaction for the estimation of hexoses and pentoses  
Anal. Biochem., 181, S. 18 – 22
- Rao, P.; Pattabiraman, T. N. (1990) Further studies on the mechanism of phenol-sulfuric acid reaction with furaldehyde derivatives  
Anal. Biochem., 189, S. 178 – 181

- Read, R. R.; Costerton, J. W. (1987) Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*  
Can. J. Microbiol., 33, S. 1080 – 1090
- Rehm, B. H. A. (1998) Alginate lyase from *Pseudomonas aeruginosa* CF1/M1 prefers the hexameric oligomannuronate as substrate  
FEMS Microbiol. Lett., 165, S. 175 – 180
- Rickard, A. H.; McBain, A. J.; Stead, A. T.; Gilbert, P. (2004) Shear rate moderates community diversity in freshwater biofilms  
Appl. Environ. Microbiol., 70 (12), S. 7426 – 7435
- Robyt, J. F. (1998) Transformations, Kap. 3, S. 48 – 75  
In: Essentials of carbohydrate chemistry, Hrsg.: Robyt, J. F.  
Springer-Verlag New York
- Rode, A. (2004) Isolierung und Charakterisierung von bakteriellen extrazellulären polymeren Substanzen aus Biofilmen  
Dissertation, Universität Duisburg-Essen
- Rodriguez, G. G.; Phipps, D.; Ishiguro, K.; Ridgway, H. F. (1992) Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria  
Appl. Environ. Microbiol., 58, S. 1801 – 1808
- Rodriguez-Montelongo, L.; de la Cruz- Rodriguez, L. C.; Farías, R. N.; Massa, E. M. (1993) Membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli*  
Biochim. Biophys. Acta, 1144, S. 77 – 84
- Rogers, J.; Dowsett, A. B.; Dennis, P. J.; Lee, J. V.; Keevil, C. W. (1994) Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora  
Appl. Environ. Microbiol., 60 (5), S. 1585 – 1592
- Romani, A. M.; Fund, K.; Artigas, J.; Schwartz, T.; Sabater, S.; Obst, U. (2008) Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation  
Microb. Ecol., 56, S. 427 – 436
- Ryssov-Nielsen, H. (1975) Measurement of the inhibition of respiration in activated sludge by a modified determination of the TTC-dehydrogenase activity  
Wat. Res., 9, S. 1179 – 1185
- Rudd, T.; Sterritt, R. M.; Lester, J. (1982) The use of extraction methods for the quantification of extracellular polymer production by *Klebsiella aerogenes* under varying cultural conditions  
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 16, S. 23 – 27
- Rudd, T.; Sterritt, R. M.; Lester, J. M. (1983) Extraction of extracellular polymers from activated sludge  
Biotechnol. Lett., 5 (5), S. 327 – 332



- Ryder, C.; Byrd, M; Wozniak, D. J. **(2007)** Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development  
Curr. Op. Microbiol., 10 (6), S. 644 – 648
- Sand, W.; Gehrke, T. **(1999)** Analysis and function of the EPS from the strong acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*, Kap. 7, S. 127 – 141  
In: Microbial Extracellular Polymeric Substances  
Hrsg.: Wingender, J.; Neu, T. R.; Flemming, H.-C.  
Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Sand, W.; Gehrke, T. **(2006)** Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria  
Res. Microbiol., 157, S. 49 – 56
- Sandt, C.; Smith-Palmer, T.; Pink, J.; Brennan, L.; Pink, D. **(2007)** Confocal Raman microspectroscopy as a tool for studying the chemical heterogeneities of biofilms *in situ*  
J. Appl. Microbiol., 103, S. 1808 – 1820
- Sanford, B. A.; Thomas, V. L.; Mattingly, S. J.; Ramsay, M. A.; Miller, M. M. **(1995)** Lectinbiotin assay for slime present in in situ biofilm produced by *Staphylococcus epidermidis* using transmission electron microscopy (TEM)  
J. Ind. Microbiol., 15, S. 156 – 161
- Santegoeds, C. M.; Schramm, A.; de Beer, D. **(1998)** Microsensors as a tool to determine chemical microgradients and bacterial activity in wastewater biofilms and flocs  
Biodeg., 9, S. 159 – 167
- Sato, T.; Ose, Y. **(1984)** Floc-forming substances extracted from activated sludge with ammonium hydroxide and EDTA solutions  
Wat. Sci. Tech., 17, S. 517 – 528
- Sauer, K; Camper, A. K.; Ehrlich, G. D.; Costerton, J. W.; Davies, D. G. **(2002)** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm  
J. Bacteriol., 184 (4), S. 1140 – 1154
- Schauer, C.; Hasselwander, H. **(2008)** Erfolgreiche Sanierung und Desinfektion einer komplexen Trinkwasseranlage  
Energie Wasser-Praxis, 59 (4), S. 30 – 37
- Schaule, G.; Flemming, H. C.; Ridgway, H. F. **(1993)** Use of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride for quantifying planktonic and sessile respiring bacteria in drinking water  
Appl. Environ. Microbiol., 59 (11), S. 3850 – 3857

- Schmeisser, C.; Stöckigt, C.; Raasch, C.; Wingender, J.; Timmis, K. N.; Wenderoth, D. F.; Flemming, H.-C.; Liesegang, H.; Schmitz, R. A.; Jaeger, K.-E.; Streit, W. R. **(2003)** Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks  
Appl. Environ. Microbiol., 69 (12), S. 7298 – 7309
- Schmidt, J. E.; Ahring, B. K. **(1994)** Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 42, S. 457 – 462
- Schmidt, M. A.; Jann, K. **(1982)** Phospholipid substitution of capsular (K) polysaccharide antigens from *Escherichia coli* causing extraintestinal infections  
FEMS Microbiol. Lett., 14, S. 69 – 74
- Schulte, S.; Wingender, J.; Flemming, H.-C. **(2005)** Efficacy of biocides against biofilms  
In: Directory of microbiocides for the protection of materials, Hrsg.: Paulus, W. Springer
- Schultheis, E.; Dreger, M. A.; Nimtz, M.; Wray, V.; Hempel, D. C.; Nörtemann, B. **(2008)** Structural characterization of the exopolysaccharide PS-EDIV from *Sphingomonas pituitosa* strain DSM 13101  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 78, S. 1017 – 1024
- Schürks, N.; Wingender, J.; Flemming, H.-C.; Mayer, C. **(2002)** Monomer composition and sequence of alginates from *Pseudomonas aeruginosa*  
Int. J. Bio. Macromol., 30 (2), S. 105 – 111
- Schwenk, R. **(2002)** *Pseudomonas aeruginosa* in einem Trinkwassernetz  
Epidemiologisches Bulletin, 40, S. 337 – 338
- Sengbusch, P. v.; Mix, M.; Wachholz, I.; Manshard, E. **(1982)** FITC-labeled lectins and Calcofluor White ST as probes for the investigation of the molecular architecture of cell surfaces. Studies on conjugatophycean species  
Protoplasma, 111, S. 38 – 52
- September, S. M.; Els, F. A.; Venter, S. N.; Brözel, V. S. **(2007)** Prevalence of bacterial pathogens in biofilms of drinking water distribution systems  
J. Wat. Health, 5 (2), S. 219 – 227
- Sarró, M. I.; García, A. M.; Moreno, D. A.; Montero, F. **(2007)** Development and characterization of biofilms on stainless steel and titanium in spent nuclear fuel pools  
J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 34, S. 433 – 441
- Sheng, G.-P.; Yu, H.-Q.; Yu, Z. **(2005)** Extraction of extracellular polymeric substances from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila*  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 67, S. 125 – 130
- Shin, D.-H.; Choi, Y.-S.; Cho, Y.-H. **(2008)** Unusual properties of catalase A (KatA) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 are associated with its biofilm peroxide resistance  
J. Bacteriol., 190 (8), S. 2663 – 2670

Sizemore, R. K.; Caldwell, J. J.; Kendrick A. S. (1990) Alternate Gram staining technique using a fluorescent lectin  
Appl. Environ. Microbiol., 56, S. 2245 – 2247

Sonawane, A.; Jyot, J.; Ramphal, R. (2006) *Pseudomonas aeruginosa* LecB is involved in pilus biogenesis and protease IV activity but not in adhesion to respiratory mucins  
Infect. Immun., 74 (12), S. 7035 – 7039

Späth, R.; Wuertz, S. (2000) Extraction and quantification of extracellular polymeric substances from wastewater, S. 51 – 68  
In: Biofilms - Investigative Methods & Applications  
Hrsg.: Flemming, H.-C.; Szewzyk, U.; Griebe, T.  
Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster

Starkey, M.; Gray, K. A.; Chang, S. I.; Parsek, M. R. (2004) A sticky business: The extracellular polymeric substance matrix of bacterial biofilms, Kap. 10, S. 174 – 191  
In: Microbial biofilms, Hrsg.: Ghannoum, E.; O'Tool, G. A.  
ASM Press, Washington D. C.

Stewart, P. S.; Camper, A. K.; Handran, S. D.; Huang, C.-T.; Warnecke, M. (1997) Spatial distribution and coexistence of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms  
Microb. Ecol., 33, S. 2 – 10

Stoodley, P.; DeBeer, D.; Lewandowski, Z. (1994) Liquid flow in biofilm systems  
Appl. Environ. Microbiol., 60, S. 2711 – 2716

Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. G.; Costerton, J. W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities  
Annu. Rev. Microbiol., 56, S. 187 – 209

Stover, C. K.; Pham, X. Q.; Erwin, A. L.; Mizoguchi, S. D.; Warrenner, P.; Hickey, M. J.; Brinkman, F. S.; Hufnagle, W. O.; Kowalik, D. J.; Lagrou, M.; Garber, R. L.; Goltry, L.; Tolentino, E.; Westbrook-Wadman, S.; Yuan, Y.; Brody, L. L.; Coulter, S. N.; Folger, K. R.; Kas, A.; Larbig, K.; Lim, R.; Smith, K.; Spencer, D.; Wong, G. K.; Wu, Z.; Paulsen, I. T.; Reizer, J.; Saier, M. H.; Hancock, R.E.; Lory, S.; Olson, M. V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen  
Nature, 406, S. 959- 964

Strathmann, M.; Wingender, J.; Flemming, H.-C. (2002) Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*  
J. Microbiol. Meth., 50, S. 237 – 248

Strathmann, M. (2003) Visualisierung und Charakterisierung von extrazellulären polymeren Substanzen in Biofilmen  
Dissertation, Universität Duisburg-Essen

Strathmann, M.; Wingender, J. (2004) Use of an oxonol dye in combination with confocal laser scanning microscopy to monitor damage to *Staphylococcus aureus* cells during colonisation of silver-coated vascular grafts  
Int. J. Antimicrob. Agent., 24 (3), S. 234 – 240

Streeter, J. G.; Salminen, S. O.; Beuerlein, J. E.; Schmidt, W. H. (1994) Factors influencing the synthesis of polysaccharides by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in field-grown soybean nodules  
Appl. Environ. Microbiol., 60, S. 2939 – 2943

Sutherland, I. W. (2001) Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures  
Wat. Sci. Technol., 43 (6), S. 77 – 86

Swedres (2006) A report on Swedish antibiotic utilisation and resistance in human medicine  
Hrsg.: Cars, O.; Liljequist, B. O.  
ISSN 1400-3473

Szewzyk, U.; Manz, W.; Amann, R.; Schleifer, K.-H.; Stenström, T.-A. (1994) Growth and in situ detection of pathogenic *Escherichia coli* in biofilms of a heterotrophic water-bacterium by use of 16S- and 23S-rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes  
FEMS Microbiol. Ecol., 13, S. 169 – 176

Szewzyk, U.; Szewzyk, R.; Manz, W.; Schleifer, K.-H. (2000) Microbiological safety of drinking water  
Annu. Rev. Microbiol., 54, S. 81 – 127

Szewzyk, U.; Conradi, B. (2003) Mikrobielle Ökologie in Trinkwasser-Biofilmen  
S. 233 – 271  
In: Erfassung des Wachstums und des Kontaminationspotentials von Biofilmen in der Trinkwasserverteilung, Hrsg.: Flemming, H.-C.  
IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung, Band 36

Tago, Y.; Aida, K. (1977) Exocellular mucopolysaccharide closely related to bacterial floc formation  
Appl. Environ. Microbiol., 34, S. 306 – 314

Takai, K.; Komatsu, T.; Horikoshi, K. (2001) *Hydrogenobacter subterraneus* sp. nov., an extremely thermophilic, heterotrophic bacterium unable to grow on hydrogen gas, from deep subsurface geothermal water  
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, S. 1425 – 1435

Takai, K.; Nealson, K. H.; Horikoshi, K. (2004) *Hydrogenimonas thermophila* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph within the  $\epsilon$ -*Proteobacteria*, isolated from a black smoker in a Central Indian Ridge hydrothermal field  
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, S. 25 – 32

- Tanious, F. A.; Veal, J. M.; Buczak, H.; Ratmeyer, L. S.; Wilson, W. D. (1992) DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) binds different to DNA and RNA: Minor-Groove binding at AT sites and intercalation at AU sites  
Biochem., 31, S. 3103 – 3112
- Tart, A. H.; Wozniak, D. J. (2008) Shifting paradigms in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm research  
Curr. Top. Microbiol. Immunol., 322, S. 193 – 206
- Teitzel, G. M.; Parsek, M. R. (2003) Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*  
Appl. Environ. Microbiol., 69 (4), S. 2313-2320
- Thomas, V. C.; Thurlow, L. R.; Boyle, D.; Hancock, L. E. (2008) Regulation of Autolysis-Dependent Extracellular DNA Release by *Enterococcus faecalis* Extracellular Proteases Influences Biofilm Development  
J. Biotechnol., 190 (16), S. 5690 – 5698
- Thurnheer, T.; Gmür, R. (2004) Guggenheim, B.; Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm  
J. Microbiol. Meth., 56 (1), S. 37 – 47
- Tielen, P. (2005) Einfluss extrazellulärer Enzyme auf die Struktur und die Eigenschaften von Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa*  
Dissertation, Universität Duisburg-Essen
- Tielker, D.; Hacker, S.; Loris, R.; Strathmann, M.; Wingender, J.; Wilhelm, S.; Rosenau, F.; Jaeger, K.-E. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation  
Microbiol., 151, S. 1313 – 1323
- Tielker, D. (2005) Physiologie und Biotechnologie des Lectins B aus *Pseudomonas aeruginosa*  
Dissertation, Universität Düsseldorf
- Titus, S.; Gaonkar, S. N.; Srivastava, R. B.; Karande, A. A. (1995) Exopolymer production by a fouling marine bacterium *Pseudomonas alcaligenes*  
Indian Journal of Marine Sciences, 24, S. 45 – 48
- Torres, C. E.; Gibello, A.; Nande, M.; Martin, M.; Blanco, A. (2008) Fluorescent *in situ* hybridization and flow cytometry as tools to evaluate the treatments for the control of slime-forming enterobacteria in paper mill  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 78, S. 889 – 897
- Torvinen, E.; Lehtola, M. J.; Martikainen, P. J.; Miettinen, I. T. (2007) Survival of *Mycobacterium avium* in drinking water biofilms as affected by water flow velocity, availability of phosphorus, and temperature  
Appl. Environ. Microbiol., 73 (19), S. 6201 – 6207

- Towler, B. W.; Rupp, C. J.; Cunningham, A. B.; Stoodley, P. **(2003)** Viscoelastic properties of a mixed culture biofilm from rheometer creep analysis  
*Biofoul.*, 19 (5), S. 279 – 285
- Troch, P.; Philip-Hollingworth, S.; Orgambide, G.; Dazzo, F. B.; Vanderleyden, J. **(1992)** Analysis of extracellular polysaccharides isolated from *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains  
*Symbiosis*, 13, S. 229 – 241
- Underwood, G. J. C.; Paterson, D. M.; Parkes, R. J. **(1995)** The measurement of microbial carbohydrate exopolymers from intertidal sediments  
*Limnol. Oceanogr.*, 40, S. 1243-1253
- Urbain, V.; Block, J. C.; Manem, J. **(1993)** Bioflocculation in activated sludge: an analytic approach  
*Wat. Res.*, 27, S. 829 – 838
- Vaerewijck, M. J. M.; Huys, G.; Palomino, J. C.; Swings, J.; Portaels, F. **(2005)** Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health  
*FEMS Microbiol. Rev.*, 29, S. 911 – 934
- Van Ommen Kloeke, F.; Geesey, G. G. **(1999)** Localization and identification of populations of phosphate-active bacterial cells associated with activated sludge flocs  
*Microb. Ecol.*, 38, S. 201 – 214
- Veiga, M. C.; Mahendra, K. J.; Wu, W.-M.; Hollingsworth, R. I.; Zeikus, J. G. **(1997)** Composition and role of extracellular polymers in methanogenic granules  
*Appl. Environ. Microbiol.*, 63, S. 403 – 407
- Verhoef, R.; Schols, H. A.; Blanco, A.; Siika-aho, M.; Rättö, M.; Buchert, J.; Lenon, G.; Voragen, A. G. J. **(2005)** Sugar composition and FT-IR analysis of exopolysaccharides produced by microbial isolates from paper mill slime deposits  
*Biotech. Bioeng.*, 91 (1), S. 91 – 105
- Vicente-Garcia, V.; Ríos-Leal, E.; Calderón-Dominguez, G.; Cañizares-Villanueva, R. O.; Olvera-Ramírez, R. **(2004)** Detection, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharide Produced by a Strain of *Phormidium* 94a Isolated From an Arid Zone of Mexico  
*Biotech. Bioeng.*, 85 (3), S. 306 – 310
- Vlassov, V. V.; Laktionov, P. P.; Rykova, E. Y. **(2007)** Extracellular nucleic acids  
*BioEssays*, 29, S. 654 – 667
- Volpi, N. **(2007)** Mass spectrometry characterization of *Escherichia coli* K4 oligosaccharides from 2-mers to more than 20-mers  
*Rap. Com. Mass Spec.*, 31, S. 3459 – 3466

- Vroom, J. M.; De Grauw, K. J.; Gerritsen, H. C.; Bradshaw, D. J.; Marsh, P. D.; Watson, G. K.; Birmingham, J. J., Allison, C. **(1999)** Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy  
Appl. Environ. Microbiol., 65, S. 3502 – 3511
- Wagner, M.; Assmus, B.; Hartmann, A.; Hutzler, P.; Springer, N.; Schleifer, K.-H. **(1994)** *In situ* analysis of microbial consortia in activated sludge using fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy  
J. Microsc., 176, S. 181 – 187
- Wagner, M.; Amann, R. **(1997)** Molecular techniques for determining microbial community structures in activated sludge, S. 61 – 72  
In: Microbial community analysis, Hrsg.: Cloete, T. E.; Muyima, N. Y.O.  
IAWQ Scientific and Technical Report No. 5
- Wagner, V. E.; Iglewski, B. H. **(2008)** *P. aeruginosa* biofilms in CF infection  
Clinic. Rev. Allerg. Immun., 35, S. 124 – 134
- Walker, J. J.; Spear, J. R.; Pace, N. R. **(2005)** Geobiology of a microbial endolithic community in the Yellowstone geothermal environment  
Nature, 434, 1011 – 1014
- Walsh, S.; Lappin-Scott, H. M.; Stockdale, H.; Herbert, B. N. **(1995)** An assessment of the metabolic activity of starved and vegetative bacteria using two redox dyes  
J. Microbiol. Meth., 24, S. 1 – 9
- Watson, C. L.; Owen, R. J.; Said, B.; Lai, S.; Lee, J. V.; Surman-Lee, S.; Nichols, G. **(2004)** Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England  
J. Appl. Microbiol., 97, S. 690 – 698
- Wawrzynczyk, J.; Szewczyk, E.; Norrlöw, O.; Dey, E. S. **(2007)** Application of enzymes, sodium tripolyphosphate and cation exchange resin for the release of extracellular polymeric substances from sewage sludge. Characterization of the extracted polysaccharides/glycoconjugates by a panel of lectins  
J. Biotechnol., 130, S. 274 – 281
- Weidler, G. H.; Dornmayr-Pfaffenhuemer, M.; Gerbl, F. W.; Heinen, W.; Stan-Lotter, H. **(2007)** Communities of *Archaea* and *Bacteria* in a subsurface radioactive thermal spring in the Austrian Alps, and evidence of ammonia-oxidizing *Crenarchaeota*  
Appl. Environ. Microbiol., 73 (1), S. 259 – 270
- Weiner, R.; Langille, S.; Quintero, E. **(1995)** Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides  
J. Ind. Microbiol., 15, S. 339 – 346

- Wellinghausen, N.; Köthe, J.; Wirths, B.; Sigge, A.; Poppert, S. (2005) Superiority of molecular techniques for identification of gram-negative, oxidase-positive rods, including morphologically nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from patients with cystic fibrosis  
J. Clin. Microbiol., 43 (8), S. 4070 – 4075
- Wentland, E. J.; Stewart, P. S.; Huang, C.-T.; McFeters, G. A. (1996) Spatial Variations in growth rate within *Klebsiella pneumoniae* colonies and biofilms  
Biotechnol. Prog., 12, S. 316 – 321
- Wetzel, R. G.; Ward, A. K.; Stock, M. (1997) Effects of natural dissolved organic matter on mucilaginous matrices of biofilm communities  
Arch. Hydrobiol., 139, S. 289 – 299
- Whitchurch, C. B.; Tolker-Nielsen, T.; Ragas, P. C.; Mattick, J. S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation  
Science, 295, S. 1487
- Williams, M. M.; Braun-Howland, E. B. (2003) Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine  
Appl. Environ. Microbiol., 69 (9), S. 5463 – 5471
- Wimmerstedt, A.; Kahlmeter, G. (2008) Associated antimicrobial resistance in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*  
Clin. Microbiol. Inf., 14, S. 315 – 321
- Wingender, J.; Neu, T. R.; Flemming, H.-C. (1999a) What are bacterial extracellular polymeric substances? Kap. 1, S. 1 – 19  
In: Microbial Extracellular Polymeric Substances  
Hrsg.: Wingender, J.; Neu, T. R.; Flemming, H.-C.  
Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Wingender, J.; Neu, T. R.; Flemming, H.-C. (1999b) Microbial Extracellular Polymeric Substances  
Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Wingender, J.; Strathmann, M.; Rode, A.; Leis, A.; Flemming, H.-C. (2001) Isolation and Biochemical Characterization of Extracellular Polymeric Substances from *Pseudomonas aeruginosa*  
Meth. Enzymol., 336, S. 302 – 314
- Wingender, J.; Jaeger, K.-E. (2002) Extracellular enzymes in biofilms, S. 1207 - 1223  
In: Encyclopedia of Environmental Microbiology, Vol. 3, Hrsg.: Bitton, G.  
John Wiley & Sons, Inc., New York
- Wingender, J.; Dannehl, A.; Bressler, D.; Flemming, H.-C. (2003) Charakterisierung von Biofilmen in Trinkwasserverteilungssystemen, S: 27 – 85  
In: Erfassung des Wachstums und des Kontaminationspotentials von Biofilmen in der Trinkwasserverteilung, Hrsg.: Flemming, H.-C.  
IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung, Band 36



- Wingender, J.; Flemming, H.-C. (2004) Contamination potential of drinking water distribution network biofilms  
Wat. Sci. Tech., 49 (11 – 12), S. 277 – 286
- Wingender, J.; Hambsch, B.; Schneider, S. (in prep.) Mikrobiologisch-hygienische Aspekte des Vorkommens von *Pseudomonas aeruginosa* in Wasser für den menschlichen Gebrauch
- Wloka, M.; Rehage, H.; Flemming, H.-C.; Wingender, J. (2004) Rheological properties of viscoelastic biofilm extracellular polymeric substances and comparison to the behavior of calcium alginate gels  
Coll. Poly. Sci., 282, S. 1067 – 1076
- Wloka, M.; Rehage, H.; Flemming, H.-C.; Wingender, J. (2006) Structure and rheological behaviour of the extracellular polymeric substance network of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms  
Biofilms, 2, S. 275 – 283
- Wodtke, J; Löhr, J. F. (2008) Das infizierte Implantat  
Orthopäde, 37, S. 257 – 269
- Wolfaardt, G. M.; Lawrence, J. R.; Robarts, R. D.; Caldwell, D. E. (1994) Multicellular organization in a degradative biofilm community  
Appl. Environ. Microbiol., 60, S. 434 – 446
- Wolfaardt, G. M.; Lawrence, J. R.; Robarts, R. D.; Caldwell, D. E. (1998) In situ characterization of biofilm exopolymers involved in the accumulation of chlorinated organics  
Microb. Ecol., 35, S. 213 – 223
- Wood, P. J. (1980) Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides  
Carbohydr. Res., 85, S. 271 – 287
- Wozniak, D. J.; Wyckoff, T. J. O.; Starkey, M.; Keyser, R.; Azadi, P.; O'Tool, G. A.; Parsek, M. R. (2003) Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms  
PNAS, 100 (13), S. 7907 – 7912
- Wrangstadh, M.; Conway, P. L.; Kjelleberg, S. (1986) The production and release of an extracellular polysaccharide during starvation of a marine *Pseudomonas* sp. and the effect thereof on adhesion  
Arch. Microbiol., 145, S. 220 – 227
- Wricke, B.; Petzoldt, H.; Hambsch, B. (2007) Mikrobiologische Situation in Hausinstallationen – Ergebnisse einer Bestandsaufnahme  
GWf Wasser Abwasser, 148 (13), S. 50 – 55
- Wu, H. (1922) A new colorimetric method for determination of plasma proteins  
J. Biol. Chem., 51, S. 33 – 39

- Wuertz, S.; Pfeleiderer, P.; Kriebitzsch, K.; Späth, R.; Griebe, T.; Coello-Oviedo, D.; Wilderer, P. A.; Flemming, H.-C. (1998) Extracellular redox activity in activated sludge  
Wat. Sci. Technol., 37, S. 379 – 384
- Wuertz, S.; Müller, E.; Spaeth, R.; Pfeleiderer, P.; Flemming, H.-C. (2000) Detection of heavy metals in bacterial biofilms and microbial flocs with the fluorescent complexing agent Newport Green  
J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 24, S. 116 – 123
- Wuertz, S.; Spaeth, R.; Hinderberger, A.; Griebe, T.; Flemming, H.-C.; Wilderer, P. A. (2001) A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals  
Wat. Sci. Technol., 43 (6), S. 25 – 31
- Zamberlan da Silva, M. E.; Filho, I. C.; Endo, E. H.; Nakamura, C. V.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P. D. (2008) Characterisation of potential virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking water  
Ant. v. Leeuwenhoek, 93, S: 323 – 334
- Zheng, N.-y.; Zhang, Y.-x.; Fan, X.; Han, L.-j. (1994) Effects of composition and structure of alginates on absorption of divalent metals  
Chin. J. Ocean. Lim., 12 (1), S. 78 – 83
- Zita, A.; Hermansson, M. (1997) Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in culture and in wastewater in situ  
FEMS Microbiol. Ecol., 152, S. 299 – 306

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Daniel Bressler, die vorliegende Arbeit mit dem Titel

“Einnistung von *Pseudomonas aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme: Eine Frage der EPS?“

selbstständig verfasst zu haben. Es wurden nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet.

Weiterhin erkläre ich, dass ich die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Duisburg,

Daniel Bressler

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Vorname, Name: Daniel Bressler  
 Adresse: Hermannstr. 43, 47226 Duisburg  
 Geburtsdaten: Geboren am 09.08.1973 in Duisburg-Rheinhausen

### Schulbesuch

08/1984 – 05/1993 Gesamtschule (Abschluss: Abitur)

### Bundeswehr

07/1993 – 06/1994 ABC-Abwehr

### Hochschulstudium

10/1994 – 10/2002 Universität Duisburg-Essen, Chemie, Schwerpunkt  
 Wasserchemie

### Promotion

Thema: Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme: Eine Frage  
 der EPS?

01/2003 – 12/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Duisburg-Essen  
 am Biofilm Centre, Aquatische Mikrobiologie

### Konferenzteilnahmen:

11/2003	Kanada:	Biofilms
04/2004	Osnabrück:	Biofilms – Prevention of Microbial Adhesion
05/2004	Mülheim:	Alternative and Conventional Anti-Fouling Strategies
04/2007	Luxemburg:	European Symposium on Waterborne Pathogens in surface water, groundwater and drinking water
01/2008	Singapur:	IWA Biofilm Technologies Conference

## Veröffentlichungen

Bressler, D.; Balzer, M.; Dannehl, A.; Flemming, H.-C.; Wingender, J. (**in prep.**) Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking-water biofilms on elastomeric material

Klebensberger, J.; Lautenschlager, K.; Bressler, D.; Wingender, J.; Philipp, B. (**2007**) Detergent-induced cell aggregation in subpopulations of *Pseudomonas aeruginosa* as a preadaptive survival strategy  
Environ. Microbiol., 9 (9), S: 2247 – 2259

Wingender, J.; Dannehl, A.; Bressler, D.; Flemming, H.-C. (**2003**) Charakterisierung von Biofilmen in Trinkwasserverteilungssystemen, S: 27 – 85  
In: Erfassung des Wachstums und des Kontaminationspotentials von Biofilmen in der Trinkwasserverteilung, Hrsg.: Flemming, H.-C.  
IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung, Band 36

## Konferenzbeiträge

11/2003

Kanada: ASM Biofilms (Posterbeitrag)  
Killing versus cleaning- two different aspects of the efficacy of biocides  
(Bressler, D.; Goroncy-Bermes, P.; Wingender, J.; Flemming H.-C.)

04/2007

Luxemburg: European Symposium on Waterborne Pathogens in surface water, groundwater and drinking water (Posterpresentation)  
Incorporation of *Pseudomonas aeruginosa* into drinking-water biofilms on elastomeric material (Bressler, D.; Balzer, M.; Dannehl, A.; Flemming, H.-C.; Wingender, J.)

01/2008

Singapur: IWA Biofilm Technologies Conference (Vortrag)  
Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking-water biofilms on elastomeric material (Bressler, D.; Balzer, M.; Dannehl, A.; Flemming, H.-C.; Wingender, J.)